

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje

Radna grupa za donošenje znanstvenog mišljenja

(Zahtjev HAH – Z – 2012-05)

Usvojeno 23. listopada 2012.

ČLANOVI RADNE GRUPE

Prof.dr.sc. Matija Domaćinović; prof.dr.sc. Jasenka Čosić; prof.dr.sc. Tomislav Klačec; dr.sc. Maja Peraica; dr.sc. Mario Mitak

KOORDINATOR IZ HAH-a:

Andrea Gross-Bošković, dipl.ing.

SAŽETAK

Najvažnijim mikotoksinima hrane za životinje smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Razvoj i intenzitet pojavnosti mikotoksina uvjetovana je mikroklimatskim čimbenicima u različitim dijelovima svijeta, te uz pogodovne ekološke prilike trajno ugrožavaju proizvodnju i skladištenje hrane za životinje. Pogodovni čimbenici pojačanog razvoja mikotoksina su toksinogene plijesni na odgovarajućoj podlozi (žitarice, ugljikohidratna podloga) i učestale vegetacijske godine s izraženijim promjenama temperature i količinom oborina. Nadalje, današnji hibridi selekcionirani su na visoke prinose, a smanjene biološke otpornosti na stres, i zbog toga lakše prijemčivi na razvoj mikotoksina. Agrotehnika koja podrazumijeva reduciranu osnovnu obradu, povećanu gustoću sklopa, uzgoj u monokulturi te povećanu zakorovljenost pogoduju razvoju mikotoksina još na polju. Mehanizirana žetva pri povećanoj vlazi i povećanom lomu zrna mogu biti tzv. „ulazna vrata“ izvoru

zaraze. Skladištenje usjeva u velikim skladišnim prostorima neminovno dovodi do miješanja zdravog i zaraženog usjeva, a nije rijetko korištenje improviziranih skladišta s povećanim naseljavanjem štetnika. Osim toga, geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete rasta pojedinih vrsta plijesni.

Mikotoksini mogu izazivati niz štetnih učinaka na ljude i životinje (karcinogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost, i dr.), pri čemu često mogu istovremeno djelovati na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o samoj tvari, dozi i vremenu izloženosti.

Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da mikotoksini učestalo kontaminiraju žitarice, te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi. U Hrvatskoj se na temelju godišnjeg plana uzorkovanja provodi sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na mikotoksine u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane.

Kako bi procijenila rizik za životinje, a posljedično i za ljude, Hrvatska agencija za hranu je provela istraživanje pod nazivom „Studija pojavnosti mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama u RH“ koje je, uz ostale stručne i znanstvene reference, služilo kao temelje za izradu ovog znanstvenog mišljenja.

Dobiveni rezultati studije ukazuju na učestalu kontaminaciju pretraživanim mikotoksinima, ali u koncentracijama znatno nižim od maksimalno dozvoljenih koncentracija aflatoksina B₁ propisanih Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/2010). Također, ostali analizirani mikotoksini (zearalenon, fumonizini, deoksinivalenol) utvrđeni su u koncentracijama koje su ispod preporuka Europske komisije.

Rizik za ciljne životinje konzumacijom krmiva pripremljenih od analiziranih sirovina – minimalan je. Rizik za potrošače proizvoda animalnog podrijetla koji potječu od životinja hranjenih ovim krmivima zanemariv je zbog niske razine kontaminacije hrane za životinje i općenito niskog prelaska ispitivanih mikotoksina u jestiva tkiva.

S obzirom na donesene zaključke dane su i preporuke za kontinuirano praćenje i analizu ključnih sirovina i gotovih krmnih smjesa u okviru specifičnih projekata kao i u okviru Državnog programa monitoringa rezidua i Državnog plana službenih kontrola i monitoringa hrane za životinje te uključivanje okratoksina A, T-2 i HT-2 toksina u buduća istraživanja pri čemu je potrebno analizirati veći broj različitih sirovina i krmnih smjesa. Analiza specifičnih krmnih smjesa za pojedine životinje treba biti usredotočena na mikotoksine na koje su te životinje posebno osjetljive.

KLJUČNE RIJEČI: mikotoksini, hrana za životinje, procjena rizika

SUMMARY

The most important mycotoxins in feed are considered to be aflatoxins, trichothecenes, fumonisins, zearalenone and ochratoxin A, which are most frequently synthesized by *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* and *Fusarium* mold species. The development and intensity of occurrence of mycotoxins is determined by microclimatic factors in different parts of the world. These factors, when coupled with favorable environmental conditions, constantly threaten the production and storage of feed. The circumstances that go in favor of intensified development of mycotoxins are toxinogenic mold on an appropriate base (grains, carbohydrate substrates) and frequent crop years with pronounced changes in temperature and rainfall. Furthermore, modern hybrids are selected for high yields, with lowered biological resistance to stress, which makes them more susceptible to the development of mycotoxins. Agrotechnics which implies reduced basic processing, increased plant density, cultivation in monoculture and increased weediness, foster the development of mycotoxins in the field. Mechanized harvesting with increased humidity and increased grain fracture can be viewed as the "entry point" for infection. Storage of crops in large storage areas inevitably leads to mixing of healthy and infected crops, and it is not uncommon to use improvised warehouses with increased colonization of pests. In addition, the geographical distribution of mycotoxins is related to the climatic conditions for growth of certain types of mold.

Mycotoxins can cause a number of adverse effects on humans and animals (carcinogenicity, immunotoxicity, digestive disorders, neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, reproductive and developmental toxicity, etc.), which can often simultaneously affect in different ways and at multiple target sites in the body, depending on the substance, the dose and length of exposure.

Long-term research in Croatia indicates that mycotoxins frequently contaminate cereals, and systematic control of mycotoxins in food and feed is necessary in order to avoid negative effects on health, as well as economic losses in agriculture. On the basis of an annual sampling plan, systematic control on mycotoxins of food of plant and animal origin is conducted in Croatia, in accredited laboratories to control food safety.

In order to assess the risk for animals, and consequently, for humans, the Croatian Food Agency conducted a study entitled "A Study of the incidence of mycotoxins in feedstuffs and feed mixtures in Croatia," which, along with other professional and scientific references, served as the basis for making this scientific opinion.

The obtained results indicate frequent contamination as regards the analyzed mycotoxin, but at concentrations much lower than the maximum allowable concentration of aflatoxin B1, defined by the Ordinance on undesirable substances in animal feed (NN 80/2010). Other mycotoxins were also analyzed (zearalenone, fumonisins, deoxynivalenol), and determined concentrations were below the recommendation of the European Commission.

The risk for the target animals consuming feed prepared from the analyzed raw materials is minimal. The risk for consumers of products of animal origin which come from animals fed with these

feeds is negligible due to the low level of contamination of animal feed and generally low crossing of the examined mycotoxins into edible tissues.

In view of these conclusions, recommendations were issued for continuous monitoring and analysis of key raw materials and finished feed mixtures under specific projects, as well as within the National monitoring plan for residues and the National plan of feed inspections and monitoring. It is further recommended to include ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxins in future research, which implies the need to analyze a larger number of different raw materials and feed compounds. The analysis of specific feeds for individual animals should be focused on mycotoxins to which these animals are particularly vulnerable.

KEY WORDS: mycotoxines, feed, risk assessment

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Radne skupine na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

SADRŽAJ	str.
SAŽETAK	1
SUMMARY	3
ZAHVALE	4
POZADINA SLUČAJA	6
UVOD	7
PROCJENA RIZIKA	8
1. Identifikacija opasnosti	8
1.1. Aflatoksini	8
1.1.1. Aflatoksin B1	9
1.2. Fumonizini	10
1.3. Zearalenon	12
1.4. Trihoteceni	14
1.4.1. Deoksinivalenol	14
2. Karakterizacija opasnosti	15
2.1. Aflatoksikoze	15
2.2. Mikotoksikoze uzrokovane zearalenonom	16
2.3. Mikotoksikoze uzrokovane fumonizinom	16
2.4. Mikotoksikoze uzrokovane deoksinivalenolom i njegovim derivatima	16
3. Procjena izloženosti	17
3.1. Metode određivanja mikotoksina	17
3.2. Kontaminiranost hrane za životinje mikotoksinima	19
3.3. Čimbenici koji utječu na rast mikotoksikogenih gljiva i produkciju mikotoksina	22
3.4. Rezultati studije pojavnosti mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama	24
3.5. Neutralizacija i uklanjanje rizika od mikotoksina	25
4. Karakterizacija rizika	27
ZAKLJUČCI	28
PREPORUKE	29
Dokumentacija dostavljena HAH-u	30
LITERATURA (REFERENCE)	31

POZADINA SLUČAJA

Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da mikotoksini učestalo kontaminiraju žitarice, te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi. U Hrvatskoj se na temelju godišnjeg plana uzorkovanja provodi sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na mikotoksine u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane.

Preuzimanjem odredbi europske legislative iz propisa o kontroli hrane za životinje izostavljeni su svi mikotoksini osim Aflatoksina B1 (Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10)) čija je količina dozvoljena do 0,02 mg/kg u krmivima, potpunim i dopunskim krmnim smjesama za goveda, koze, ovce, svinje i perad, u ostalim krmnim smjesama do 0,01 mg/kg, dok je u smjesama za životinje namijenjene proizvodnji mlijeka ta količina do 0,005 mg/kg. Zbog toga se danas za procjenu kontaminacije nekim mikotoksinima (deksinivalenol, zearalenon, okratoksin A, T-2, HT-2 i fumonizini) u hrani za životinje koriste preporučene vrijednosti, sukladno Preporuci Europske komisije 2006/576/EC (COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC) u proizvodima namijenjenima za hranidbu životinja.

Najveće dopuštene količine mikotoksina u hrani koja se stavlja u promet propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (N.N. 154/2008). U navedenom Pravilniku određena je najveća dopuštena koncentracija za aflatoksin, okratoksin A, patulin, deksinivalenol, zearalenon, fumonizin te T-2 toksin i HT-2 u žitaricama i njihovim prerađevinama namijenjenim ljudskoj prehrani.

U okviru projekta „Pravno i institucionalno usklađivanje zakonodavstva sa zakonodavstvom Europske unije“ koji se financira zajmom Svjetske banke, Hrvatska agencija za hranu provela je istraživanje pod nazivom „Studija pojavnosti mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama u RH“ koje je, uz ostale stručne i znanstvene reference, služilo kao temelje za izradu ovog znanstvenog mišljenja.

UVOD

Toksični učinci mikotoksina počeli su se znatnije proučavati od 1960. godine kada je akutno otrovanje aflatoksinom, poznato kao "X bolest pura", uzrokovalo uginuće 100.000 purića u Engleskoj od akutne nekroze jetre i hiperplazije žučnih kanala. S identifikacijom i izolacijom aflatoksina 1960. g. započeo je znanstveni rad na otkrivanju više od 400 danas poznatih toksičnih sekundarnih metabolita plijesni, od kojih samo njih 20-30, prema obimu pojavnosti i toksičnom učinku na zdravlje ljudi i životinja, ima medicinski, nutritivni, ekološki i gospodarski značaj (Jakić-Dimić 2010).

Najvažnijim mikotoksinima stočne hrane smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Huwig et al, 2001).

Od 100 000 vrsta plijesni koliko ih je do danas poznato, preko 200 vrsta ima sposobnost proizvoditi mikotoksine.

Razvoj i intenzitet pojavnosti mikotoksina uvjetovana je mikroklimatskim čimbenicima u različitim dijelovima svijeta, te uz pogodovne ekološke prilike trajno ugrožavaju proizvodnju i skladištenje stočne hrane. Tako se tijekom izuzetno vlažnih godina, kao što je bila 1978. g., bilježe znatno veće koncentracije mikotoksina, dok je u posljednje vrijeme uočena smanjena učestalost pojave mikotoksina u žitaricama, a i koncentracija mikotoksina je niža, što se pripisuje sušnijem razdoblju tijekom vegetacije.

Za pojavnost plijesni i njihovih metabolita odgovorni su:

1. odgovarajući sadržaj vlage (slobodna ili aktivna voda),
2. pogodne temperature,
3. prisutnost kisika,
4. fizička oštećenja na usjevima, i
5. prisutnost gljivičnih spora.

Pogodovni čimbenici pojačanog razvoja mikotoksina su toksinogene plijesni na odgovarajućoj podlozi (žitarice, ugljikohidratna podloga) i učestale vegetacijske godine s izraženijim promjenama temperature i količinom oborina. Nadalje, današnji hibridi selekcionirani su na visoke prinose, a smanjene biološke otpornosti na stres, i zbog toga lakše prijemčivi na razvoj mikotoksina. Agrotehnika koja podrazumijeva reduciranu osnovnu obradu, povećanu gustoću sklopa, uzgoj u monokulturi te povećanu zakorovljenost, pogoduju razvoju mikotoksina još na polju. Mehanizirana žetva pri povećanoj vlazi i povećanom lomu zrna mogu biti tzv. „ulazna vrata“ izvoru zaraze. Skladištenje usjeva u velikim skladišnim prostorima neminovno dovodi do miješanja zdravog i zaraženog usjeva, a nije rijetko ni korištenje improviziranih skladišta s povećanim naseljavanjem štetnika.

Geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete rasta pojedinih vrsta plijesni. Tako se npr. aflatoksini (koje uglavnom sintetiziraju *Aspergillus* spp.) nalaze češće i u većim koncentracijama na krmivima u tropskom i subtropskom području (Južna Amerika, Oceanija, Indonezija), a okratoksini, zearalenon i trihoteceni (koje uglavnom sintetiziraju *Penicillium* i *Fusarium* spp.) nalaze se u umjerenom klimatskom području (Sjeverna Amerika, Europa, Azija i Rusija). Ovo je vrlo važno za pravilno usmjeravanje analitike krmiva na mikotoksine ovisno iz kojeg podneblja ona dolaze.

Mikotoksini mogu izazivati niz štetnih učinaka na ljude i životinje (karcinogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost, i dr.), pri čemu često mogu istovremeno djelovati na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o samoj tvari, dozi i vremenu izloženosti.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

1.1. Aflatoksini

Aflatoksini su najpoznatiji i najtoksičniji mikotoksini. Prvi puta su opisani u Engleskoj 1960. godine (Prasanna i sur., 1975, Hussein i Brasel, 2001). Tvore ih neki sojevi plijesni roda *Aspergillus*. Za rast im pogoduju temperature od 26–38 °C i sadržaj vlage veći od 18 %. Aflatoksini su metabolički produkti plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* koje ih sintetiziraju već u polju, kao i tijekom žetve te skladištenja i prerade žitarica, pri temperaturi između 24 i 35 °C i vlažnosti iznad 7 % (10 % u ventiliranom prostoru) (Williams i sur. 2004). *Aspergillus flavus* sintetizira aflatoksine B₁ i B₂ na žitaricama poput kukuruza, dok *Aspergillus parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B₁, B₂, G₁ i G₂ na uskladištenim uljaricama (Diener i Davis, 1996, Valpotić i Šerman, 2006).

Aflatoksini su kao prirodni fluorescirajući spojevi, derivati kumarina, vidljivi u UV–spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G bazirana su upravo na njihovim fluorescentnim svojstvima; B za plavu (*blue*) i G za zelenu (*green*) fluorescenciju (Prasanna i sur., 1975). Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja (Kiermeier i Hemmerich, 1974, Marth i Dole, 1979). Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo netopljivi u vodi (Mann i sur., 1967). Dokazana je kontaminacija žitarica, proizvoda na bazi žitarica, ali i mesa i iznutrica svinja i peradi te jaja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995, Richard, 2007, Husain i sur., 2010).

1.1. 1. Aflatoksin B₁

Aflatoksini su skupina mikotoksina od kojih je najtoksičniji aflatoksin B₁ (AFB₁) (Domijan i Peraica 2010). Ciljni organ toksičnog djelovanja AFB₁-a je jetra, a izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i uhranjenosti. Uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Otrovanje s velikim dozama AFB₁-a može imati smrtni ishod, subletalne doze uzrokuju kronično otrovanje, a kronična izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno primarni karcinom jetre. AFB₁ inhibira sintezu DNA, polimerazu RNA ovisnu o DNA, sintezu glasničke RNA i sintezu proteina. Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) ocijenila je da ima dovoljno dokaza da su aflatoksini iz prirodnih izvora karcinogeni i uvrstila ih je u 1. skupinu karcinogena (IARC 2012).

Plijesni koje proizvode aflatoksine nalaze se posvuda te u zemljama u razvoju kontaminiraju osnovne namirnice kao što su riža, kukuruz, kasava, orasi, kikiriki i začini. Kontaminacija tim plijesnima moguća je između 40^o sjeverne i 40^o južne širine ako su namirnice loše pohranjene i nedovoljno osušene, no kontaminacija aflatoksinima ovisna je o klimi (Cotty i Jaime-Garcia 2007).

Biološka aktivnost aflatoksina ovisi o njegovom metaboliziranju pa različita osjetljivost životinjskih vrsta ovisi o tome koji se dio apsorbirane doze metabolizira nekim od mogućih putova. Nepovoljan učinak aflatoksina je najviše izražen kod peradi (patke > brojleri > nesilice), a potom kod svinja. Na aflatoksine vrlo su osjetljive i ribe, pri čemu se javljaju blijede škrge, oslabljeno zgrušavanje krvi, anemija, smanjen rast ili pad tjelesne mase. AFB₁ aktiviraju monooksigenaze ovisne o citokromu P450 čime nastaju hidroksilirani derivati kao i visoko reaktivni egzo-epoksid koji se veže na DNA pri čemu nastaju AFB₁-DNA-adukti (Guengerich 2003). Količina AFB₁-DNA-adukata veća je u jetri negoli u drugim organima i u korelaciji je s dozom kao i s osjetljivošću pokusne ili domaće životinje na hepatokarcinogenezu (Hengstler i sur. 1999).

Najvažniji put detoksikacije metabolita AFB₁ je konjugacija s glutationom (GSH) koju katalizira glutation S-transferaza pri čemu nastaju AFB₁-GSH-konjugati koji se izlučuju urinom ili žuči, a ta reakcija određuje otpornost pojedinih životinjskih vrsta prema AFB₁ (Klein i sur. 2000).

Biomarkeri izloženosti mikotoksinu AFB₁ su proteinski i DNA adukti, a serumski adukti s albuminima u dobroj su korelaciji s DNA aduktima u urinu (Groopman i sur. 1992).

Akutna se aflatoksikoza kod ljudi i životinja manifestira kao gubitak apetita, povraćanje, slabost i letargija. Nekroza i hiperplazija žučnih kanalića može se vidjeti u jetri domaćih i pokusnih životinja izloženih ovom mikotoksinu. Godine 1974. u epidemiji aflatoksikoze u ruralnom dijelu Indije do koje je došlo zbog kontaminacije kukuruza, glavni su simptomi bili žutica, kratka febrilna epizoda, povraćanje i anoreksija (Krishnamachari i sur. 1975, Tandon i sur. 1977). U blažim slučajevima oporavak je bio potpun, dok je kod drugih brzo nastajao ascites (za 2-3 tjedna) i edemi donjih udova. Smrt je nastupala naglo, obično nakon masivnog krvarenja iz probavnog sustava, a smrtnost je prema različitim autorima bila 10-29% (Krishnamachari i sur. 1975, Tandon i sur. 1977, Bhat i

Krishnamachari 1977). Histološke promjene u jetri bile su jaka proliferacija žučnih vodova, stvaranje vezivnog tkiva, značajan zastoj žuči i difuzno oštećenje parenhima. Godine 1981. tijekom epidemije aflatoksikoze simptomi su bili slični u 20 pacijenata u Keniji (od kojih je 12 umrlo) (Ngindu i sur. 1982). Na istom području Kenije tijekom epidemije 2004. godine od 317 oboljelih umrlo je 125 ljudi (CDC 2004).

Primarni karcinom jetre peti je najčešći karcinom na svijetu, a u 75-90% slučajeva radi se o hepatocelularnom karcinomu (HCC) (McGlynn i London 2005). U nekim zemljama, kao što su to dijelovi Kine, Afrike i Azije gdje je učestalost HCC-a naročito izražena, nađena je povezanost incidencije HCC-a s izloženošću aflatoksinom B₁ (Kensler i Groopman 1997). Rizik nastanka HCC-a značajno je viši u osoba koje su izložene većim koncentracijama AFB₁ (pa imaju višu koncentraciju adukata bilo s DNA ili albuminom) i osoba koje su bolovale od virusnog hepatitisa B (HBV) ili virusnog hepatitisa C (HCV).

Aflatoksin B₁ i B₂ se u mliječnim žlijezdama sisavaca metaboliziraju u aflatoksini M₁ i M₂, koji se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Knežević, 2007; Diener i Davis, 1996; Valpotić i Šerman, 2006). Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka i mliječnih proizvoda, izloženost relativno malim količinama AFM₁ može značajno narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Cavaliere i sur., 2006).

1.2. Fumonizini

Fumonizini su prvi puta opisani 1988. godine. Fumonizine stvaraju gljive roda *Fusarium* koje su česte u umjerenim i toplim klimatskim zonama. Najčešći proizvođači fumonizina su *Fusarium verticillioides* (prije zvan *F. moniliforme*), no proizvode ih i neke druge plijesni kao što su *F. proliferatum*, *F. nygamai*, i *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* (Bennet i Klich 2003, Creppy, 2002, Richard 2007). Fumonizini nastaju prije žetve i tijekom ranog razdoblja sušenja, a njihova koncentracija ne raste tijekom skladištenja (IPCS 2001).

Fumonizin je bijeli higroskopni prah topiv u vodi, acetonitrilu i vodi odnosno metanolu. Stabilan je u otopini acetonitril: voda (1:1) dok je u metanolu nestabilan. Također je stabilan tijekom pripreme hrane i nije fotosenzibilan (WHO, 2000).

Od 14 različitih fumonizina najčešći zagađivači hrane i krmiva su FB₁, FB₂ i FB₃. U prirodi je najčešći FB₁ - diester propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Zinedine i Manes, 2009), a to je ujedno i toksikološki najznačajniji fumonizin (IPCS 2001). FB₁ se može naći po cijelome svijetu u kukuruza i proizvodima od kukuruza. Budući da je topiv u vodi njegova je koncentracija niža u proizvodima od kukuruza (kukuruzne pahuljice, tortilje i sl.) (Peraica i sur. 2002). Fumonizine se rjeđe nalazi na drugim žitaricama kao što su to šećerni sirak i riža (IPCS 2001), a vrlo se često pronalazi i u kombinaciji sa drugim mikotoksinima. Fumonizini su utvrđeni u Africi, Americi, Europi Aziji i Oceaniji, ponekad u koncentraciji i do 4000 mg/kg (Soriano i Dragacci 2004).

Istraživanja na različitim životinjskim vrstama pokazala su da fumonizini nisu akutno toksični (IPCS 2001). Fumonizini se slabo absorbiraju i brzo nepromijenjeni eliminiraju iz organizma (Martinez-Larranga i sur. 1999). FB₁ se ne akumuliraju u tkivima, ali se male koncentracije mogu naći u bubrezima i jetri pokusnih životinja tretiranih s FB₁ (Norred i sur. 1993). Mehanizam njihovog djelovanja ne ovisi o metaboličkoj aktivaciji. Toksični učinci fumonizina ovise o vrsti životinje, soju i spolu (Voss i sur. 2007). Visoke doze FB₁ uzrokuju leukoencefalomalaciju konja, štakora i kunića, plućni edem i hidrotoraks svinja, a u glodavaca je nefrotoksičan i hepatotoksičan (IPCS 2001).

Fumonizini su strukturno slični sfingoidnim bazama i njihova je toksičnost posljedica ometanja metabolizma sfingolipida inhibiranjem ceramid sintaze (Wang i sur. 1999). Do promjena u koncentraciji sfingolipida dolazi u pokusnih životinja prije negoli dođe do oštećenja bubrega (Peraica i sur. 2008).

FB₁ je kao karcinogen za glodavce uvršten u skupinu mogućih karcinogenih spojeva za ljude (Skupina 2B) (IARC, 2002). U muških BDIX štakora koji su tijekom 26 mjeseci bili izloženi mikotoksinu FB₁ u hrani (50 mg/kg) nađena je povećana učestalost HCC-a i holangiosarkoma (Gelderblom i sur. 1991). Kronična izloženost u muških F344 štakora uzrokovala je povećani broj tumora bubrega kao i povećanu učestalost tumora jetre u ženskim B6C3F₁ miševa (NTP 1999).

FB₁ uzrokuje regenerativnu hiperplaziju hepatocita i promotor je tumora unatoč značajnoj proapoptotičnoj aktivnosti. Iako su istraživanja na kulturama stanica ukazivala na to da je oksidativni stres mehanizam genotoksičnosti FB₁ (Abel i Gelderblom 1998), u novijim se istaživanjima došlo do zaključka da je oksidativni stres posljedica, a ne uzrok toksičnosti FB₁ (Domijan i sur. 2007).

Jedini opisani slučaj akutne toksikoze uzrokovane s FB₁ dogodio se u Indiji, a simptomi su bili bol u abdomenu i proljev (Bhat i sur. 1997). Izloženost mikotoksinu FB₁ povezuje se s povećanom učestalošću karcinoma jednjaka u južnoafričkoj pokrajini Transkei i u sjevernoj Italiji (IPCS, 2001). U tim krajevima, kao i u kineskoj pokrajini Linxan gdje je izrazito visoka incidencija karcinoma jednjaka, povezanost nastanka tumora s izloženošću FB₁ nije se uspjela dokazati epidemiološkim istraživanjima (Abnet i sur. 2001). Istovremena izloženost aflatoksinima i fumonizinima povezuje se kao faktor rizika u razvoju hepatocelularnog karcinoma u kineskoj provinciji Haimenu (Ueno 1997) i Guanxiju (Li i sur. 2001). U prilog ovoj pretpostavci govori i sinergistički učinak ta dva mikotoksina dobiven na pokusnim životinjama (Gelderblom i sur. 2002).

Smatra se da je izloženost trudnica fumonizinu B₁ koji se nalazi u kukuruzu mogući čimbenik rizika za nastanak oštećenja neuralne cijevi u djece u južnom Teksasu (SAD), Meksiku, Guatemali, Kini i Južnoj Africi (Marasas i sur. 2004). Te su pretpostavke potvrđene epidemiološkim istraživanjima i pokusima na životinjama (Missmer i sur. 2006, Gelineau-van Waes i sur. 2005).

FB₁ nije prisutan u mlijeku, mesu ili jajima životinja hranjenih hranom kontaminiranom fumonizinima u koncentracijama koje bi narušavale ljudsko zdravlje (WHO, 2000). Međutim, prisutnost fumonizina u hrani za životinje može imati negativan učinak na kakvoću mesa, koji se odnosi prije svega na povećan udio masti i smanjeni udio mesa, što će kod proizvođača rezultirati velikim ekonomskim gubicima (Valpotić i Šerman, 2006.). Nadalje, ovi toksini uz oštećenja jetre izazivaju i

smanjenu proizvodnju mlijeka u mliječnim krava pri koncentraciji u hrani većoj od 100 mg/kg. Inače, razina fumonizina u stočnoj hrani obično se kreće u rasponu od 1-10 mg/kg.

1.3. Zearalenon

Zearalenon, nekada zvan F-2 toksin, je metabolit toksogenih plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno *F. graminearum* i nekih izolata *F. moniliforme*, *F. oxysporium*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* i drugih, a prvotno je izdvojen iz kulture *Giberella zeae*; spolnog stadija plijesni *F. graminearum* (Betina, 1989, Duraković i Duraković, 2003, Naglič i sur., 2005).

Zearalenon pripada skupini fitoestrogena (Srebočan, 1993). Fitoestrogeni su komponente prirodno prisutne u biljkama kojima je zajednička karakteristika kemijska sličnost sa prirodnim i sintetskim hormonima estrogenima. Najintenzivniji rast plijesni roda *Fusarium* odvija se pri relativnoj vlažnosti zraka većoj od 70% i temperaturi 18-24°C, a za aktivaciju enzima uključenih u sintezu toksina potrebna je niža početna temperatura (Abramson, 1998., Šumić, 2009, Šperanda i sur., 2005). Optimalna pH vrijednost medija za rast plijesni i sintezu zearalenona je 4 do 6,5. Rastu nekih vrsta *Fusarium*, npr. *F. graminearum*, pogoduju temperaturne oscilacije između 15 i 30°C pri čemu se povećava sinteza zearalenona.

Prema fizikalno-kemijskim svojstvima zearalenon je lakton rezorcilne kiseline, 6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undecil)-β-rezorcilna kiselina (Zollner i sur., 2002., Alexander i sur., 2004). Redukcijski produkt zearalenona je zearalenol, koji ima dva stereoizomera; alfa i beta, od kojih je samo α-zearalenol prisutan u prirodi i četiri puta je aktivniji od zearalenona dok je β-zearalenol samo neznatno aktivniji. Zearalenon je bijela kristalna tvar molekulske formule C₁₈H₂₂O₅, molekulske mase 318 g/mol i temperature topljivosti 165°C. Netopljiv je u vodi, ugljičnom disulfidu i ugljičnom tetrakloridu, a topljiv u vodenim alkalijama, dietil eteru, benzenu, kloroformu, metilenkloridu, etilacetatu, acetonitrilu i alkoholima. ZEA se brzo apsorbira nakon oralnog uzimanja, a izlučuje se u žuči (Zinedine i sur. 2007). Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja i prerade, a ne razgrađuje se ni pri visokim temperaturama (Hagler i sur., 1979., Betina, 1989, Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Zollner i sur., 2002., Alexander i sur., 2004).

Najvažnija je prisutnost zearalenona kao prirodnog kontaminanta zrnja kukuruza, pšenice, ječma, raži, zobi, riže, soje i sezama, kao i u brokuli, hmelju i kupusu. Do kontaminacije dolazi na polju, ali se rast plijesni i tvorba toksina nastavlja i tijekom skladištenja, osobito ako je ono neprikladno (Zinedine i sur. 2007). Zearalenon i produkti njegova metabolizma mogu se naći i u plijesnima onečišćenoj silaži, kikirikiju, stočnoj hrani i proizvodima fermentacije kukuruza kao što je pivo, ali i u hrani životinjskog porijekla (mesu, mlijeku i sirevima). Zbog ekonomskih i ekoloških ograničenja u proizvodnji žitarica koja zahtijevaju minimalnu obradu i smanjenu upotrebu fungicida, sve je veći broj infekcija žitarica *Fusarium* vrstama i veća je kontaminacija mikotoksinima, pa su u posljednje vrijeme

slučajevi infekcija zearalenonom češći kod ekološki uzgojenih žitarica u odnosu na konvencionalne proizvode (Utermark i Karlovsky, 2007).

Molekula ZEA vrlo je slična molekuli estradiola, a sličnost konfiguracije i polarnosti s estradiolom može objasniti afinitet prema mjestima vezivanja estrogenskih receptora (Lindsay 1985). Zearalenon i njegovi metaboliti poznati su po estrogenim i anaboličkim osobinama jer uzrokuju inhibiciju hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize te atrofiju jajnika, sjemenika, prostate i sjemenskih vezikula, a smatra se da zearalenon djeluje i kao fungalni spolni hormon (Duraković i Duraković, 2003). Odgovoran je za morfološke i funkcionalne poremećaje reproduktivnih organa i oštećenje spolnih stanica kod domaćih životinja što dovodi do hiperestrogenizma goveda, svinja i peradi, a najosjetljivije su svinje (Richardson i sur. 1985, Mitterbauer i sur., 2003).

Mehanizam djelovanja ZEA i njegovih derivata jest vezanje za estrogene receptore u citoplazmi stanica spolnih organa, pri čemu nastaje fiziološki odgovor stanica sličan djelovanju prirodnog estrogena 17- β -estradiola čije se vezanje za receptore citosola uterusa inhibira (Alexander i sur., 2004, Mitterbauer i sur., 2003). ZEA je hepatotoksičan, hematotoksičan i remeti proces koagulacije u štakora (Abid-Essefi i sur. 2004). Akutna toksičnost ZEA je niska, glodavci su manje osjetljivi od domaćih životinja na kratkotrajnu izloženost ZEA (Fink-Gremmels i sur. 2007.)

Simptomi izloženosti ZEA su upala rodnice (vulvovaginitis), a u životinja koje nisu spolno zrele prolaps rektuma i rodnice. Estrus može biti produljen, smanjen je spolni nagon, životinje su neplodne, dolazi do mumifikacije fetusa, pobačaja, mrtvorodenosti i smanjenog okota (Visconti i sur. 1998). Kod muških životinja može uzrokovati atrofiju sjemenika i povećanje mliječnih žlijezda. Na pokusnim je životinjama dokazano da ZEA prolazi kroz placentu u fetus (El-Makawy i sur. 2001).

Osim estrogenog djelovanja, ZEA inhibira lučenje folikulstimulirajućeg hormona (FSH) zbog čega potiskuje razvoj folikula ovarija i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekt pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću i anestriju (Osweiler, 1996, Gaffoor i Trail, 2006). Vezanjem za estrogene receptore ZEA uzrokuje hormonsku neravnotežu i dovodi do hiperestrogenizma kod domaćih životinja. Svinje su najosjetljivija vrsta na djelovanje ZEA i kod njih su mikotoksikoze najčešće (Naglić i sur., 2005). Kod prasadi se hiperestrogenizam pojavljuje već pri koncentraciji ZEA-a od 0,06 mg/kg TM, dok odrasle svinje toleriraju u hrani koncentraciju od 0,2-0,4 mg/kg. Perad i preživači su znatno manje osjetljivi.

Klinički znakovi se razlikuju ovisno o vrsti životinje, starosti i reproduktivnom statusu a vidljivi su tek nakon izloženosti kontaminiranom krmivu. Uobičajene komplikacije su funkcionalni poremećaji reproduktivnog i endokrinog sustava. (Mitterbauer i sur., 2003, Peraica i Domijan, 2001).

IARC je 1993. godine svrstao ZEA u 3. skupinu (nema karcinogena svojstva za ljude) zbog nedostatnih istraživanja na ljudima i ograničenim istraživanjima na pokusnim životinjama.

1.4. Trihoteceni

Trihotecene sintetiziraju plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. crookwellense*, itd.). Do sada je izolirano i karakterizirano 170 trihotecena, a tek za njih nekoliko je potvrđen toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Bennet i Klich, 2003). Na osnovu svoje kemijske strukture mogu se podijeliti u četiri skupine: A, B, C i D. Trihoteceni iz skupine A i B najčešće se nalaze kao kontaminanti u hrani, i to u pšenici, kukuruзу, ječmu i zobi, a mogu se nalaziti i u prerađenim proizvodima: brašnu, kukuruznim pahuljicama, hrani za dojenčad, sladu i pivu.

Najvažniji trihoteceni su:

tip A: T-2 toksin, HT-2 toksin i diacetoksiscirpenol (DAS)

tip B: nivalenol (NIV), deoksinivalenol (DON), fuzarenon X (FUS X), 3-acetil-deoksinivalenol (3-ac-DON), i 15-acetil-deoksinivalenol (15-ac-DON).

Najtoksičniji su T-2 toksin i diacetoksiscirpenol koji izazivaju niz gastrointestinalnih, dermatoloških i neuroloških simptoma na tretiranim pokusnim i domaćim životinjama (Bennet i Klich, 2003). Kod ljudi se trovanje najčešće povezuje s probavnim i imunotoksičnim posljedicama (Murphy i sur., 2006). Primjerice, zabilježeno je više slučajeva masovne pojave tzv. alimentarne toksične aleukije (upala želučane i crijevne sluznice, leukopenija, anemija, sepsa, itd.) nakon konzumacije pljesnivog žita u Rusiji (Bennet i Klich, 2003), koja se povezuje s izloženošću T-2 toksinu.

1.4.1. Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON, vomitoksin), tetraciklički epoksi-seskviterpen, pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina (Türker i Gümüs, 2009), a prvi je puta izoliran iz oštećenih zrna ječma 1972. godine. Javlja se uglavnom kod žitarica poput pšenice, ječma i kukuruza, a rjeđe kod zobi, riže i raži. Produkcija deoksinivalenola primarno je povezana sa *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, a naročito mu pogoduju vlažnija klimatska podneblja (aktivnost vode od 0,97) i temperatura od 25-28°C (Dooan i sur., 2003, National Toxicology Program, 2009).

DON je bezbojan prah, topiv je u polarnim otapalima poput vode, metanola, etanola, acetonitrila i etil-acetata. Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i toplinske obrade hrane (National Toxicology Program, 2009). Pretpostavlja se da može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla poput mesa i mlijeka (Cavret i Lecoer, 2006). Međutim, u buragu preživača DON se metabolizira u DON-1 koji je znatno manje toksičan od izvorne forme. DON i njegovi metaboliti brzo se izlučuju iz organizma prije svega urinom, ali u vrlo malim koncentracijama i mlijekom (Whitlow i sur., 2006).

DON se smatra manje toksičnim trihotecenom, ali je važan zbog kontaminacije hrane diljem svijeta (Valpotić i Šerman, 2006).

Deoksinivalenol se vrlo često može naći u žitaricama, uglavnom zajedno s 3-acetildeoksinivalenolom i 15-acetildeoksinivalenolom (Pathre i Mirocha, 1978; Marpegan i sur 1988; Birzele i sur 2000; Fazekas i sur 2000).

2. Karakterizacija opasnosti

Iako su danas dobro poznati mehanizmi djelovanja pojedinih mikotoksina i utvrđene toksične doze i granice tolerancije, učestalost pojavljivanja otvara pitanja interakcije više toksina istovremeno u manifestiranju toksičnog učinka. Na primjer, dok su DON i fumonizin B1 pojedinačno pokazali tek slabe znakove smanjenog dnevnog prirasta u svinja, istovremena izloženost je značajno smanjila rast (Harvey i sur., 1996). Stoga treba imati na umu da su ciljni organizmi često izloženi kombinacijama mikotoksina koje djeluju sinergistički u izazivanju toksičnosti.

2.1. Aflatoksikoze

Aflatoksikoze se mogu definirati kao trovanja uzrokovana aflatoksinima (Janssen i sur., 1997). Dijele se na perakutne, akutne, subakutne i kronične. Perakutno trovanje uzrokuje kolaps i smrt već nekoliko sati nakon uzimanja zatrovane hrane. Akutni i subakutni oblici javljaju se nakon uzimanja kontaminirane hrane kao hepatotoksikoza i nefrotoksikoza. Patomorfološko otrovanje obilježava bljedoća jetre s mozaičnim nekrozama parenhima i hemoragijom, dok je u bubrezima prisutan glomerulonefritis. Kronična aflatoksikoza odlikuje se kongestijom jetre sa jako izraženim simptomima nekroze, hemoragije i proliferacijom epitelijskih stanica žučovoda (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). AFB₁ jedan je od najznačajnijih prirodnih karcinogena sa izrazito visokom toksičnošću te je po preporuci Agencije za istraživanje raka IARC, (*International Agency for Research on Cancer*) svrstan je u skupinu 1 tj. skupinu spojeva s dokazanim karcinogenim učinkom u ljudi. Uzročnik je karcinoma jetre, jednog od učestalijih karcinoma u razvijenim zemljama (Wogan, 1999). Također, neka istraživanja upućuju na sinergističke učinke aflatoksina i hepatitisa B kao uzročnika karcinoma jetre u ljudi (Henry i sur., 2002). Kronična izloženost AFB₁ kod riba uzrokuje tumor jetre, koji se pojavljuje kao blijedožute lezije i također mogu se širiti do bubrega. Visoka je stopa uginuća. Nadalje, aflatoksikoze imaju depresivan učinak na imunološki sustav, zbog čega su ribe kontaminirane aflatoksinima više osjetljivije na bakterijske, virusne ili parazitarne bolesti. (Russo i Yanong, 2002).

AFM₁ je karcinogen za životinje, te se procjenjuje da je karcinogen za ljude, ali sa znatno nižim potencijalom nego AFB₁ (van Egmond i Speijers, 1990).

2.2. Mikotoksikoza uzrokovana zearalenonom

Mikotoksikoza uzrokovana zearalenonom kod sisavaca se očituje oticanjem spolnih organa, edemom vulve, uterusa i vagine, hipertrofijom mliječne žlijezde, grlića i stijenke maternice, staničnom proliferacijom uterinih žlijezda, kočenjem spolnih funkcija u hipotalamusu te u prednjem režnju hipofize i gonadama kod oba spola sisavaca. (Srebočan, 1993, Ožegović i Pepeljnjak, 1995., i Hussein i Brasel, 2001.). Pri težim oblicima otrovanja javljaju se prolapsus rodnice i rektuma, paraliza stražnjih nogu i smrt. U nerastova zearalenon smanjuje koncentraciju testosterona, težinu testisa i spermatogenezu pa svinje pokazuju karakteristike feminizacije (atrofiju testisa i povećanje dojki) i smanjeni libido (Miraglia i sur., 1998, Pepeljnjak i sur., 2008).

Visoke koncentracije zearalenona (50 -100 mg/kg) utječu negativno na ovulaciju, začecje, usađivanje i razvoj zametka (Pepeljnjak i sur., 2008), a nakon duže izloženosti mogu zaustaviti normalni reproduktivni ciklus (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Uočeni su preuranjeni pubertetni simptomi kod djece u čijoj je plazmi bila detektirana prisutnost zearalenona. ZEA je u devedesetim godinama 20. stoljeća pronađen u krvi djevojčica s preuranjenim spolnim sazrijevanjem (Portoriko) koje su se hranile hranom kontaminiranom ZEA (Saenz DE Rodriguez, 1984) te kod djevojčica s preuranjenim pubertetom (Mađarska), koje su se hranile organski uzgojenom hranom u kojoj je također bio prisutan spomenuti mikotoksin (Szuets i sur., 1997).

2.3. Mikotoksikoza uzrokovana fumonizinom

Malo je relevantnih podataka koji se odnose na metabolizam FB₁ kod ljudi. Kod eksperimentalnih životinja apsorpcija je vrlo slaba te je brza eliminacija urinom i fecesom. Vrlo male količine fumonizina zaostaju u jetri i bubregu (WHO, 2000). Literaturni podaci navode da se fumonizini mogu povezati s rakom jednjaka kod ljudi, dok kod štakora uzrokuju rak jetre, a kod svinja plućni edem (Valpotić i Šerman, 2006). Fumonizini uzrokuju leukoencefalomalaciju konja, magaraca i mula odnosno omekšavanje bijele tvari u mozgu (Richard, 2007) te plućne edeme u svinja (Delaš, 2010). IARC je zbog premalo epidemiološki istraživanja na ljudima i zbog dovoljno dokaza karcinogenosti za životinje uvrstila FB₁ u skupinu 2B.

2.4. Mikotoksikoza uzrokovana deoksinivalenolom i njegovim derivatima

Deoksinivalenol i njegovi derivati najčešće u svinja iritiraju sluznicu probavnog trakta uz pojavu pojačanog slinjenja, odbijanja hrane te povraćanje (Vesonder i sur. 1979). Takva karakteristična klinička slika rezultira odbijanjem hrane, ili smanjenim konzumiranjem hrane, odnosno povraćanjem uzete hrane. Kod ljudi izloženih kontaminiranim žitaricama uzrokuje akutnu mučninu, povraćanje, proljev, bol u trbuhu, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu (National Toxicology Program, 2009). Djelatna količina

toksina je prema literaturnim podacima dubiozna, jer su životinje odbijale hranu s 0,5 mg/kg vomitoksina (Bergsjö i sur., 1992), 0,3-0,7 mg/kg nije izazvao ozbiljnije posljedice osim smanjenog uzimanja hrane (Trenholm i sur., 1983), ali sličan učinak kod prasadi ima količina od 2 mg/kg (Trenholm i sur., 1984), s time kako prirodno stvoreni mikotoksin ima bolji učinak od pročišćenog (Prelusky i sur., 1994).

IARC je 1993. godine zaključila da ne postoji dovoljno dokaza na eksperimentalnim životinjama koji ukazuju na karcinogenost DON-a te ga je svrstala u skupinu 3. Međutim, dokazano je sinergističko djelovanje DON-a u kombinaciji s drugim mikotoksinima, npr. u kombinaciji s aflatoksinom B1 ima izražajnije mutageno djelovanje (National Toxicology Program, 2009).

3. Procjena izloženosti

3.1. Metode određivanja mikotoksina

Zbog tendencije mikotoksina da nastaju u neravnomjerno raspoređenim točkama unutar mase uroda, nužno je uzeti uzorak koji je reprezentativan za ukupnu količinu rasute pošiljke ili pohranjenih sirovina za proizvodnju stočne hrane. Uzorkovanje je svakako kritična točka procjene kontaminacije jer nereprezentativan uzorak može navesti na krive zaključke o stanju sirovine ili proizvoda (Turner i sur., 2009).

Mikotoksini mogu izazivati štetne posljedice kod niskih koncentracija te je za analizu potrebno primijeniti pouzdane i osjetljive metode. Ovisno o raspoloživoj opremi, simultana analiza većeg broja mikotoksina može biti problem zbog različite strukture i svojstava ovih spojeva. Poseban problem predstavljaju i tzv. maskirani mikotoksini za čiju je kvantifikaciju nužno postojanje odgovarajućih standarda ili se uzorak može podvrći kiselinskoj, alkalnoj ili enzimskoj hidrolizi radi oslobađanja mikotoksina iz konjugata. Zbog zakonske regulative vezane uz maksimalne količine mikotoksina u raznim matriksima, posljednjih godina raste potražnja za jednostavnijim, brzim i jeftinijim načinima analize, koje može provoditi i neznanstveno osoblje. Osim testova za brzu kvalitativnu analizu poput lateralnog protočnog testa (lateral flow test), na terenu su također popularni prijenosni uređaji za brzu kvantitativnu analizu (Goryacheva i De Saeger, 2011).

Ekstrakcija mikotoksina iz uzorka ovisi o strukturi ciljnog spoja, pri čemu se polarni metaboliti (npr. fumonizini) ekstrahiraju polarnim otapalima, dok će se organska otapala koristiti za izdvajanje hidrofobnih spojeva poput aflatoksina. Odabir ekstrakcijskog sredstva ili kombinacije otapala ovisi i o vrsti matriksa u kojem se mikotoksini nalaze. Nakon ekstrakcije, kod provedbe većine metoda osim ELISA postupaka te onih koje uključuju primjenu visokoosjetljivih LC-MS/MS uređaja, slijedi predtretman uzoraka tj. prečišćavanje ekstrakta. Tzv. *clean up* je vrlo važan korak u pripremi analize jer čistoća ekstrakta utječe na osjetljivost analize (Turner i sur., 2009). Naime, interferirajuće supstance mogu maskirati signal analizirane tvari koja se u uzorku nalazi u vrlo malim

koncentracijama. Metode koje se primjenjuju uključuju tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju koja se bazira na različitoj topljivosti toksina u vodenoj i nemješivoj fazi organskog otapala. Ekstrakcija superkritičnim fluidima iz matriksa je vrlo učinkovita, ali i skupa tehnika. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid phase extraction, SPE) kombinira ekstrakciju i prečišćavanje uzorka i te uključuje primjenu jednokratnih kromatografskih kolona kroz koje se ekstrakt propušta. Ovisno o čvrstoj fazi (C18 silikagel, silikati, polimerne smole, ionsko-izmjenjivačke tvari, antitijela, polimeri s molekularnim biljegom (molecularly imprinted polymers, MIP) i dr. (Maragos, 2009)) nečistoće se zadržavaju na koloni ili ispiru s kolone, nakon čega se eluira čisti ekstrakt s kolone. SPE kolone se primjenjuju u brojnim protokolima ne samo zbog brzine i manje potrošnje otapala, nego i zbog učinka koncentriranja toksina koje neke izvedbe kolona omogućuju. Također se sve više koristi mikroekstrakcijska SPME (solid phase microextraction) metoda kod koje se primjenjuje sonda na čijem se vrhu nalazi sloj čvrste faze koji se uranja u ekstrakt (Turner i sur., 2009). Za analizu krutina koristi se i disperzija matriksa i čvrste faze (matrix solid phase dispersion, MSPD), pri čemu se miješaju čvrsta faza (dijatomejska zemlja) i uzorak, nakon čega se mješavina prebaci u kolonu i ekstrahira odgovarajućim otapalom.

Separacija analita iz ekstrakta može se provesti tankoslojnom kromatografijom (thin layer chromatography, TLC), visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (high performance liquid chromatography, HPLC), plinskom kromatografijom (gas chromatography, GC), ili kapilarnom elektroforezom (capillary electrophoresis, CE) (Turner i sur., 2009). Iako je HPLC uglavnom pretekla TLC po popularnosti, potonja tehnika se i dalje koristi zbog brze provedbe, niske cijene i lakoće identifikacije ciljnih spojeva, iako je prečišćavanje uzoraka nužno. HPLC koristi različite kolone za razdvajanje toksina na temelju polarosti te se detekcija obavlja uz UV/Vis, fluorescentne detektore, masene spektrometre (MS), itd. Ponekad je nužna pred- ili postkolonska derivatizacija mikotoksina prije detekcije, iako kod većine metoda detekciji prethodi samo prečišćavanje na SPE kolonama i separacija na HPLC-u. GC je obično povezan s MS-om, plameno-ionizacijskim detektorom ili Fourierovim transformacijskim infracrvenim spektrometrom za detekciju hlapljivih tvari. Kako većina mikotoksina nije hlapljiva, provodi se prethodna derivatizacija sililacijom ili polifluoroacilacijom. Razdvajanje mikotoksina u električnom polju prema naboju i masi princip je rada CE. Opisane su osjetljive metode analize aflatoksina i fumonizina primjenom fluorescentnog detektora. Kombinacije HPLC-a ili GC-a s MS-om (GC-MS, LC-MS ili LC-MS/MS) su postale standardne metode detekcije u industriji jer omogućavaju točnu i specifičnu detekciju toksina (Krska i Molinelli, 2007). Postoji velik broj varijacija ionizatora i analizatora koji su se pokazali učinkovitim u analizi mikotoksina. Ipak, moderne izvedbe LC-MS/MS-a visoke osjetljivosti omogućavaju i istovremenu analizu većeg broja mikotoksina, eventualno uz odvojenu ekstrakciju pojedinih spojeva i objedinjavanje ekstrakata prije injiciranja u uređaj. Nedostaci hibridnih tehnika su visoka cijena uređaja, posebni zahtjevi za laboratorije te ograničenja vezana za vrstu otapala koja se mogu rabiti u ekstrakciji i separaciji.

Osim separacijskih tehnika, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) je našla široku primjenu u analizi mikotoksina (Goryacheva i De Saeger, 2011). Kompetitivna verzija tehnike se najčešće koristi i uključuje dodatak konjugata toksina i enzima ekstraktu uzorka. Vezanje konjugata za

mikrotitarske pločice s imobiliziranim antitijelom je, zbog kompeticije, obrnuto proporcionalno količini mikotoksina u uzorku, pri čemu se dodaje supstrat koji s enzimom daje obojeni produkt koji se određuje spektrometrijski. Razvijene metode za analizu mikotoksina primjenom komercijalnih kitova su brze, specifične te relativno jeftine i jednostavne u provedbi (također pogodne za terenski rad), iako je osjetljivost slabija od HPLC tehnika. Uočeno je i podcjenjivanje ili, češće, precjenjivanje količine mikotoksina u odnosu na rezultate dobivene HPLC-om. Ovo je najčešće vezano uz učinak matriksa i prisustvo spojeva slične građe, uključujući maskirane mikotoksine, koji mogu reagirati s antitijelom (Goryacheva i De Saeger, 2011). Fluorometarska analiza je također učinkovita tehnika određivanja mikotoksina. Preduvjet kvalitetne analize je uklanjanje ostalih fluorescirajućih tvari koje mogu utjecati na rezultate, najčešće nekom od SPE tehnika, te derivatizacija radi jačanja fluorescentnog signala.

3.2. Kontaminiranost hrane za životinje mikotoksinima

Kakva je zdravstvena vrijednost hrane za životinje glede plijesni, govori i podatak FAO-a, da je danas oko 25-35 % te hrane kontaminirano plijesnima (Jard i sur. 2009). Ove podatke u određenoj mjeri potvrđuju domaća istraživanja, gdje je kroz 30 god. praćena pojava plijesni roda *Fusarium* i *Penicillium*, pri čemu je konstatirana podjednaka (40-60%) zastupljenost u usjevima, zbog čega su žitarice i druga krmiva često kontaminirani okratoksinom A (OTA) i zearalenonom (ZEA) od 20-30 % uzoraka.

Specifičnost mikotoksina je u velikim osciliranjima učestalosti koja se prema navodima Pepeljnjaka i Šegvić-Klarić (2004.) tijekom 4 godine (1975.-79. g.) ispitivanja ZEA- a i T-2 toksina na kukuruzu i drugim žitaricama varirala od 2,6-46%. Maksimalne koncentracije ZEA-a su izmjerene (1978/79.) od 275,8 mg/kg, a T-2 toksina 20,5 mg/kg. U istom razdoblju visoku koncentraciju mikotoksina očekivano je pratila i povećana učestalost kontaminacije usjeva plijesnima roda *Fusarium*.

Tablica 1. Stočna hrana i njeni primarni mikotoksin

Mikotoksini	Krmiva
Aflatoksini	Sirak, soja, kukuruz, pšenica, ječam
Oktratoksini	Ječam, zob, pšenica, raž
Trihoteceni	Ječam, zob, sirak, soja, kukuruz, pšenica
Fumonizini	Kukuruz, soja, sirak
Zearalenon	Ječam, sirak, kukuruz, pšenica, silaža (trava,

	leguminoze, kukuruz)
Ergot alkaloidi	Raž i druge žitarice
Toksini vlasulja Lolitermi, Peramin, Ergot alkaloidi	Vlasulje i druge vrste trava
Roquefortin	Silaža (trava, kukuruz, leguminoze)
Citrinin	Ječam, pšenica, zob, kukuruz
Ciklopijazonična kiselina	Kukuruz, pšenica
Patulin	Silaža (trava, kukuruz, leguminoze)

Žitarice kao najvažnija skupina koncentriranih krmiva važan su izvor energije za sve kategorije životinja, i dominantna su krmiva u koncentriranim smjesama, pa su zato mogući izvor kontaminiranosti hrane za životinje. Na domaćem tržištu žitarice su najčešće kontaminirane trihotecenima, fumonizinima B1 (FB1) i B2 (FB2), okratoksinom A (OTA) i zearalenonom (ZEA). No, u uvjetima opće globalizacije tržišta krmiva za hranu za životinje ne treba zanemariti realnu opasnost i od ostalih mikotoksina kao što su aflatoksini i okratoksini.

Rezultati analize uzoraka kukuruza svih županija Hrvatske pokazali su vrlo veliku učestalost kontaminacije s FB₁ (100%) i veliku učestalost kontaminacije sa ZEA (84%), dok su ostali mikotoksini znatno rjeđe prisutni. Analizirajući prisutnost okratoksina A u 49 uzoraka kukuruza na području četrnaest (14) županija, Peraica i sur. (2004) su konstatareli da je ova žitarica kontaminirana OTA-om u 39 % uzoraka, ali je koncentracija pozitivnih uzoraka bila niska (1,47 µg/kg).

Ispitivanjem koontaminacije 15 uzoraka kukuruza sakupljenih u Hrvatskoj 2002. god. utvrđeno je da su svi uzorci sadržavali plijesni roda *Fusarium* i *Penicillium* spp, a u 5 uzoraka i *Aspergillus* spp. Toksinogene su plijesni koje sintetiziraju fumonizine pronađene u 14 uzoraka, a toksinogene plijesni zearalenona u svim uzorcima. U ispitivanim uzorcima nađeni su mikotoksini FB₁(15/15), ZEA (12/15), OTA (7/15) i FB₂ (2/15).

Istraživanje 2007. god. na 80 uzoraka žitarica, uljane repice i krmnih smjesa, na seoskim gospodarstvima u tri županije (Varaždinska, Brodsko-Posavska i Osječko-Baranjska). Rezultati su potvrdili prisutnost plijesni roda *Rhizopus* 56,2 %, *Aspergillus* 37,5 %, *Penicillium* 35,5%, i *Fusarium* 21,2 %. U ovom istraživanju ipak nije dokazana toksigenost sojeva *Aspergillus flavus*, nije utvrđena prisutnost aflatoksina, a niti u sojevima *Fusaria* nije dokazana prisutnost zearalenona, fumonizina, i trihotecena.

Mikotoksikološka analiza na 37 uzoraka žitarica iz seoskih gospodarstava s područja endemske nefropatije pokazali su znatno drugačije rezultate (Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Kosalec I. Komparacija ELISA i TLC/HPLC metoda za određivanje ZEA i OTA u žitaricama i krmi.

Krmiva 2008; 50: 235-244). ZEA je nađen u 91,9 % uzoraka, u konc. od 6,6 - 1168 µg/kg, aflatoksini u 40,5 % uzoraka, u konc. od 1,1 - 10,3 µg/kg, fumonizini u 27 % uzoraka u konc. od 200 - 20700 µg/kg, a okratoksin A u 21,6 % uzoraka u konc. od 2 - 31,7 µg/kg. Kontaminiranost žitarica s dva mikotoksina utvrđena je u 35 % uzoraka, s tri mikotoksina utvrđena je u 19 % uzoraka, a s četiri mikotoksina utvrđena je u 2,7 % uzoraka.

Šegvić-Klarić i Pepeljnjak (2004) su tijekom 20 god. (1980.-1997.) provodeći ispitivanje na stočnim krmivima i animalnim proizvodima utvrđivali toksikogeni potencijal *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* vrsta, koje se javljaju kao učestali kontaminanti uzoraka hrane i hrane za životinje. U spomenutom razdoblju *Aspergillus* vrste (*A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*) utvrđene su u visokoj učestalosti u uzorcima suhomesnatih proizvoda, uskladištenim žitaricama i grahu (59 - 70%). Tijekom posljednjih 6 godina sakupljani su uzorci kukuruza prezimjelog u polju i uskladištenog u domaćinstvima na području EN (endemske nefropatije) u Hrvatskoj, pri čemu je utvrđena visoka učestalost *Fusarium* vrsta (70 %), najviše *F. verticillioides* (40 %).

Puntarić i sur. (2004) ispitivali su prisutnosti aflatoksina i okratoksina A u različitim prehrambenim namirnicama u nas. Prisutnost aflatoksina evidentirana je u 11,9 % uzoraka, a okratoksina tek u 1,5 % slučajeva, pri čemu su sve koncentracije prema Pravilniku (NN 39/2003) i direktivi Europske Unije bile ispod maksimalno dopuštenih koncentracija. Iako su koncentracije utvrđenih mikotoksina u dozvoljenim koncentracijama, autori ipak napominju da se kontrola na prisutnost mikotoksina u hrani za ljude mora sustavno provoditi. Naglasili su da zbog neravnomjernog rasporeda mikotoksina u hrani posebnu pozornost valja obratiti načinu uzorkovanja i količini uzorka koji bi bio reprezentativan.

Jakić-Dimić i sur. (2010) su u Republici Srbiji istraživali prisutnost plijesni u kukuruzu i pšenici (747 uzorka) te gotovoj hrani za perad (263 uzorka) tijekom pet (5) godina (ELISA). Mikološkom analizom žitarica utvrdili su na čak 70 % uzoraka veću koncentraciju plijesni od Pravilnikom dopuštene, a najveći intenzitet zagađenosti plijesnima je evidentiran na prirodno sušenom kukuruzu. U gotovim krmnim smjesama za perad sadržaj plijesni je bio ispod maksimalno dozvoljenih vrijednosti. Mikotoksikološkom analizom u velikom broju uzoraka je utvrđena prisutnost mikotoksina, ali u dopuštenim vrijednostima prema Pravilniku. Najveća prisutnost je bila zearalenona (64,6 %), potom okratoksina (44,6 %), aflatoksina (18,7 %) i T-2 toksina (5,4 %). Autori zaključuju da je istraživanje potvrdilo kontaminiranost krmiva i stočne hrane plijesnima i njihovim metabolitima, te da se zbog toga praćenje mikotoksina u stočnoj hrani treba sustavno kontrolirati.

U posljednje vrijeme sijanjem visokorodnih hibrida nedovoljne biološke otpornosti, primjena suvremene tehnike žetve, praćena neodgovarajućim uvjetima transporta i skladištenja, osobito u meteorološki nepovoljnim godinama, dodatno utječe na razvoj bolesti, a time i na pojavu mikotoksina.

Ovu tvrdnju potkrjepljuje istraživanje učestalosti mikotoksina u žitaricama i grahu tijekom 1991. god. i tijekom Domovinskog rata, pri čemu je zabilježena povećana koncentracija ZEA (do 19,9 mg/kg) i DON-a (do 12,4 mg/kg), što je posljedica povećane kontaminacije *Fusarium* vrsta u polju tijekom vegetacije. Istim ispitivanjem na kukuruzu također je utvrđeno povećanje koncentracije ovih mikotoksina (ZEA do 10,7 mg/kg, i T-2 do 25,5 mg/kg).

S obzirom na statistički prosjek (1999.-2001.) potrošnje žitarica po stanovniku (112,4 kg), prosječne ukupne količine unosa mikotoksina godišnje su oko 8,7 mg. Ko-kontaminacija hrane nefrotoksinima (OTA i fumonizini) i njihov mogući sinergizam može doprinijeti razvoju EN. Također, istodobno pojavljivanje fuzariotoksina (trihotecena, ZEA i fumonizina) i OTA može doprinijeti razvoju sekundarnih infekcija i tumora, ovisno o dozi i vremenu izloženosti. Svjetski znanstvenici ističu da unatoč tome što ove bolesti nisu zarazne, ne izazivaju uginuća životinja, niti pandemije u ljudi, objektivno predstavljaju veliku opasnost s obzirom na kumulativno djelovanje više mikotoksina tijekom nekoliko godina.

3.3. Čimbenici koji utječu na rast mikotoksikogenih gljiva i produkciju mikotoksina

Gljive su se tijekom evolucije prilagodile životu na različitim supstratima i različitim agroekološkim uvjetima. Fitopatogene gljive općenito, uključujući i one koje produciraju mikotoksine, mogu zaraziti biljke tijekom vegetacije na polju, tijekom žetve, manipulacije do skladišta i tijekom skladištenja. Obzirom na vrijeme infekcije biljaka i njihovih proizvoda toksikogene gljive se mogu podijeliti u tri grupe (Suttajit, 1989.): gljive koje zaražavaju biljke u polju koje za infekciju i razvoj, u pravilu, trebaju visoku vlagu zraka ili vlažnost tla (*Fusarium*, *Alternaria*), skladišne gljive koje nemaju velike zahtjeve za vlagom (*Aspergillus*, *Penicillium*) i gljive koje naseljavaju samo prethodno oštećena tkiva (*Rhizopus*, *Mucor*, *Chaetomium*, neke *Aspergillus* vrste). Prisustvo simptoma na zaraženim biljkama ne znači nužno i kontaminaciju biljaka i biljnih proizvoda mikotoksinima, kao što niti odsustvo simptoma ne znači da biljka nije inficirana i da nema sinteze toksina.

Metabolizam gljiva, a time i produkcija mikotoksina, pod značajnim su utjecajem vanjskih čimbenika, pa je tako utvrđeno da je u godinama povoljnim za razvoj fuzarijske paleži klasa količina DON-a u pšeničnom brašnu dva do tri puta veća u odnosu na godine s izratito sušnim vremenom u periodu od cvjetanja pšenice do kraja vegetacije (Ćosić i sur., 2006.). Infekcija biljaka, rast i razvoj gljiva u biljnom organizmu i sinteza mikotoksina ovise o temperaturi okoline, aktivitetu vode, relativnoj vlazi zraka i vlazi tla, pH sredine, prisustvu/odsustvu kisika, prisustvu/odsustvu kompetitora, sposobnosti izolata gljive za produkciju mikotoksina, količini inokuluma, ishrani biljaka, prisustvu/odsustvu štetnika i primjeni fungicida i njihovoj međusobnoj interakciji.

Temperatura je značajan čimbenik koji utječe na infekciju i razvoj bolesti kao i na sintezu mikotoksina. Većina fitopatogenih gljiva prisutnih u područjima umjereno kontinentalne klime se

razvija u širokom temperaturnom rasponu između 5 i 35°C, a optimalne temperature za sintezu mikotoksina u pravilu su nešto niže od optimalnih za rast i razvoj gljive. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* su dominantno gljive aridnih, semiaridnih i tropskih područja, iako ih nalazimo i u drugim područjima i razvijaju se na temperaturama između 10 i 43°C, a aflatoksin sintetiziraju na temperaturama između 12 i 40°C (Koehler i sur. 1985., Bock i sur. 2004.). Za infekciju i razvoj najznačajnijih uzročnika fuzarijske truleži klipa i zrna kukuruza (*Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum*) optimalne temperature su između 20 i 25°C (Ćosić i Vrandečić 2002., Ćosić i sur. 2004., Svitlica i sur. 2011.). Optimalna temperatura za sintezu aflatoksina je između 25 i 30°C (Faraj i sur. 1991.), fumonizina B1 i B2 je između 24 i 25°C (Dilkin i sur. 2002.), DON-a između 20 i 25°C (Ramirez i sur. 2005., Schmidt-Heydt i sur. 2011.), a zearalenona 25°C (Milano i Lopez 1991.).

Gljive za svoj razvoj i produkciju mikotoksina trebaju povećanu količinu vode. Optimalna relativna vlaga zraka za navedene procese je, kod većine gljiva, iznad 85%, a kod nekih i iznad 90 ili 95%. Visoka relativna vlaga zraka ne znači nužno i velike količine oborina. Učestale vrlo male količine kiše (npr. 0,5 do 1 mm) ili jake dugotrajne rose, što je uobičajena pojava u našim krajevima, dovoljne su za održavanje povoljne mikroklimе u usjevu što je npr. izrazito povoljno za razvoj fuzarijske paleži klasa, a time i za jaču kontaminaciju mikotoksinima koje te gljive produciraju. Optimalna vrijednost aktiviteta vode za produkciju mikotoksina je visoka i iznosi za aflatoksine 0,95 do 0,99 (Faraj i sur. 1991.), fumonizine 0,956 do 0,958 (Marin i sur. 1995.), zearalenon 0,95 do 0,97 (Jimenez i sur. 1996.) i DON 0,995 (Ramirez i sur. 2006.).

Uzročnici plijesni se, općenito, razvijaju u širokom rasponu vrijednosti pH (3,0–8,0) s optimumom između 5,0 i 6,0. Vrste roda *Aspergillus* tolerantije su na alkalnu, a vrste roda *Penicillium* na jače kiselu sredinu (Wheeler i sur. 1991.). Prema Svitlica (2010.) *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides* i *F. subglutinans* se najbrže razvijaju kod pH 6,5, iako se dobro razvijaju i kod pH 7,0.

Sve gljive koje zaražavaju biljke i biljne dijelove i/ili kontaminiraju proizvode za ljudsku i stočnu ishranu za životne procese trebaju kisik, a podjednako su im značajni kisik iz zraka i onaj koji se nalazi u kontaminiranom/zaraženom supstratu. Ipak valja naglasiti da se neke gljive mogu razvijati i pri vrlo niskim koncentracijama kisika odnosno visokim koncentracijama CO₂.

Prisutnost nekih bakterija i gljiva može značajno usporiti ili potpuno spriječiti rast gljiva i produkciju mikotoksina. Supresivno djelovanje različitih gljiva na rast i razvoj fitopatogenih gljiva utvrdili su mnogi znanstvenici. Tako je za neke izolate gljiva *Trichoderma viride* i *Rhodococcus erythropolis* (Reddy i sur. 2010.) i *Trichoderma harzianum* (Agüero i sur. 2008.) utvrđeno antagonističko djelovanje na *Aspergillus flavus*. Osim na navedenu vrstu vrste iz roda *Trichoderma* imaju značajno antagonističko djelovanje i na vrste iz rodova *Fusarium*, *Sclerotinia* i *Cladosporium* (Barbosa i sur. 2001., Louzada i sur. 2009., Carvalho i sur. 2011.)

Svi izolati iste *Fusarium* vrste ne produciraju jednaku količinu mikotoksina (Bagi i sur. 2000, Ferreira Geraldo i sur. 2006, Ćosić i sur. 2008.), a sposobnost sinteze ovisi o genotipu producenta i uvjetima okoline. Istraživanjima sposobnosti produkcije DON-a za 14 izolata *F. graminearum* je

utvrđeno da je količina toksina u zrnu pšenice nakon umjetne infekcije varirala između 2,51 i 12,14 mg/kg (Ćosić i sur. 2008.).

3.4. Rezultati studije pojavnosti mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama u RH

Studija je provedena s ciljem prikazivanja stanja zaraženosti dominantnih krmiva (sačma soje, kukuruz) koja količinski čine najveći udio u svih krmnih smjesa. Analitička istraživanja su provedena kod 20 najvećih subjekata u proizvodnji hrane za životinje u Republici Hrvatskoj. Obim i intenzitet zaraženosti navedenih krmiva analiziran je na 300 uzoraka (181 kukuruza, 119 sačma soje) iz vegetacijske godine 2011., a obuhvaćena su četiri (4) mikotoksina (aflatoksin, zearalenon, deoksinivalenol, fumonizin). Uzorci su analizirani metodom ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Tablica 2 prikazuje rezultate analize, prema kojoj je aflatoksin otkriven u 20% uzoraka u rasponu koncentracije mikotoksina od 1-10 µg/kg, deoksinivalenol je otkriven u 27% uzoraka u rasponu koncentracije mikotoksina od 55- 500 µg/kg, fumonizin je otkriven u 33% uzoraka u rasponu koncentracije mikotoksina od 220-2000 µg/kg, a zearalenon je otkriven u 12% uzoraka u rasponu koncentracije mikotoksina od 16-100 µg/kg.

Potrebno je istaknuti da analizirani uzorci sojine sačme potječu iz Hrvatske i Brazila te da nije uočena značajna razlika u sadržaju mikotoksina s obzirom na podrijetlo uzoraka.

Tablica 2. Broj uzoraka te relativna učestalost pojave mikotoksina pri određenoj koncentraciji

Aflatoksin (granica detekcije 1 µg/kg)						
Uzorak	Broj uzoraka, < 1,0 µg/kg	Udio u %, < 1,0 µg/kg	Broj uzoraka, 1.0-2,0 µg/kg	Udio u %, 1,0-2,0 µg/kg	Broj uzoraka, 2,0-10,0 µg/kg	Udio u %, 2,0-10,0 µg/kg
1. Kukuruz	139	77	38	21	4	2
2. Sačma soje	100	84	19	16	0	0
3. Ukupno (1.+2.)	239	80	57	19	4	1
Deoksinivalenol (granica detekcije 55 µg/kg)						
Uzorak	Broj uzoraka, < 55,0 µg/kg	Udio u %, < 55,0 µg/kg	Broj uzoraka, 55-200 µg/kg	Udio u %, 55-200 µg/kg	Broj uzoraka, 200-500 µg/kg	Udio u %, 200-500 µg/kg

	µg/kg		µg/kg		µg/kg	
1. Kukuruz	135	75	36	20	10	6
2. Sačma soje	83	70	36	30	0	0
3. Ukupno (1.+2.)	218	73	72	24	10	3
Fumonizini (granica detekcije 220 µg/kg)						
Uzorak	Broj uzoraka, < 220,0 µg/kg	Udio u %, < 220,0 µg/kg	Broj uzoraka, 220-1000 µg/kg	Udio u %, 220-1000 µg/kg	Broj uzoraka, 1000-2000 µg/kg	Udio u %, 1000-2000 µg/kg
1. Kukuruz	81	45	59	33	41	23
2. Sačma soje	119	100	0	0	0	0
3. Ukupno (1.+2.)	200	67	59	20	41	14
Zearalenon (granica detekcije 16 µg/kg)						
Uzorak	Broj uzoraka, < 16,0 µg/kg	Udio u %, < 16,0 µg/kg	Broj uzoraka, < 16-100,0 µg/kg	Udio u %, < 16,0-100,0 µg/kg		
1. Kukuruz	180	99	1	1		
2. Sačma soje	85	71	34	29		
3. Ukupno (1.+2.)	265	88	35	12		

Svi analizirani uzorci su zadovoljili odredbe važećeg Pravilnika (NN 80/2010) s obzirom na maksimalno dozvoljenu razinu AFB₁ te preporuke Europske komisije (2006/576/EC) o najvišim koncentracijama ZEA, ukupnih fumonizina, i DON-a u stočnoj hrani. Nije bilo razlike između koncentracija AFB₁, ZEA i DON-a u kukuruzu i sojnoj sačmi, dok fumonizini u potonjoj sirovini nisu ni detektirani.

3.5 Neutralizacija i uklanjanje rizika od mikotoksina

Uzimajući u obzir da je realna prisutnost kao i izražen toksičan učinak plijesni i mikotoksina u stočnoj hrani s jedne strane, te da se higijenski sigurna hrana postavlja sve važniji preduvjet na tržištu stočne hrane, svakim se danom sve veća pažnja posvećuje usavršavanju postojećih i primjeni novih tehnoloških postupaka u cilju prevencije i dekontaminacije mikotoksina u hrani (Hotger, 2000).

Iako je znano da se prisutnost mikotoksina ne može u potpunosti izbjeći, preporučene mjere prevencije u cilju sprečavanja pojave mikotoksina u hrani za životinje odnose se na kvalitetnije kontroliranje uvjeta proizvodnje i uvjeta skladištenja (propionska kis. za žitarice, sijeno i silažu, CO₂,

hladno skladištenje, sušenje žitarica, poboljšanje fermentacije kod siliranja-dodaci enzima, probiotika, bakterija).

Tehnike kojima se razina mikotoksina može smanjiti na toleriranu vrijednost je čišćenje, termička obrada te korištenje adsorbenata mikotoksina. S obzirom na kontaminaciju mikotoksinima u polju, učinak ovih mjera ne može u dovoljnoj mjeri smanjiti njihovu prisutnost u krmivima. Prema Pravilniku o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10) nije dozvoljeno razrjeđivanje kontaminiranog krmiva s nekontaminiranim (Članak 5. „ proizvode koji sadrže nepoželjne tvari u količini većoj od najveće dopuštene količine zabranjeno je miješati u svrhu njihovog razrjeđenja“). Na žalost, to se u praksi često provodi.

Kao neke od mogućih preventivnih mjera smanjenja pojavnosti mikotoksina je i stvaranje otpornih genotipova, inhibicija razvoja plijesni i sinteze mikotoksina, sprečavanjem resorpcije mikotoksina u probavnom sustavu, kao i dekontaminacija mikotoksina fizičkim i kemijskim metodama.

Mehaničke metode. Dekontaminacija mikotoksina u hrani za životinje mehaničkim metodama odnosi se na čišćenje (izdvajanje oštećenih, nerazvijenih, tamno obojenih zrna), a drugi postupak je skidanje aleuronskog sloja krmiva koji je najviše zaražen. Ovim načinom je moguće smanjiti kontaminiranost i do 30 %.

Kemijske metode. Korištenje koktela organskih kiselina i soli kod konzerviranja krmiva.

Hidrotermički tretmani. Ovdje se misli na ekstrudiranje, ekspaniranje, kondicioniranje i dr. No, ne treba zaboraviti da su neki mikotoksini tremostabilni (trihoteceni, okratoksin A i patulin), te da se zagrijavanjem ne smanjuje njihova toksičnost. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja određenim toplinskim postupcima može se smanjiti udio i aktivnost sljedećih mikotoksina.

- Kuhanjem krmiva količina aflatoksina B₁ se smanjuje 10 – 20 %
- Prženjem krmiva smanjuje se aflatoksini B₁, G₁, G₂ za 40 – 50 %
- Pečenjem krmiva se smanjuje količina aflatoksina za 10 – 17 %
pečenjem kruha alkaloidi ergotamini smanjuju se za 75-100 %
- Autoklaviranjem smanjuje se količina aflatoksina za oko 67%

Ipak, važnim se čini kontrola temperature toplinskog postupka, jer u slučaju previsoke temperature dolazi do pucanja zaštitne opne i povećava se slobodna intergranularna vodena para u silosu.

Metoda mikofiksatora. Jedna od metoda dekontaminacije hrane mikotoksinima je smanjenje bioraspoloživosti toksina u hrani, dodatkom aluminosilikatne gline, montmorillonit u obroku. Montmorillonit je pokazao da potiče rast i poboljšava učinkovitost hrane (Tauquir i Nawaz, 2001), smanjuju bakterijsku kontaminaciju crijeva (Venglovsky i sur., 1999), smanjuje štetne učinke mikotoksina iz zagađene hrane (Schell i sur., 1993), te da štite crijevnu sluznicu (Droy-Lefain i sur., 1985).

Druga mogućnost su primjena organskih adsorbenasa kao što je glukomanan proizveden iz stjenke stanice kvasca. Za razliku od prethodnih anorganskih ovi adsorbensi imaju bolji učinak

vezanja većeg broja mikotoksina, termostabilan je, bio-razgradiv i aktivan je u širem rasponu pH vrijednosti.

Kako su svojstva mikotoksina različita, za neutralizaciju pojedinih mikotoksina primjenjuju se i zasebne metode (stupanj apsorpcije, tremolabilnost).

Bilo kojom metodom detoksikacije hrane se služili, potrebno je udovoljiti sljedećim uvjetima:

- ⇒ da se mikotoksini transformiraju u netoksične spojeve,
- ⇒ da se detoksikacijom sprečava novo stvaranje plijesni i toksina,
- ⇒ da hrana ne mijenja nutritivnu vrijednost,
- ⇒ da se detoksikacijom značajnije ne mijenja fizička karakteristika krmiva,
- ⇒ metoda mora biti i ekonomski opravdana.

Značaj navedenih mjera prevencije u borbi s mikotoksinima je višestruko opravdan:

1. Mikotoksini se u krmivima javljaju bez izraženih vanjskih znakova, skriveni su,
2. Ne postoji jedinstvena metoda dekontaminacije krmiva zaraženih mikotoksinima, niti se ista mogu potpuno dekontaminirati,
3. Mikotoksini su kemijski stabilni spojevi i ne odstranjuju se postupkom tehnološke obrade,
4. Kada se izazovu toksikoze ne postoji program liječenja niti postoje specificirani lijekovi.

Ipak, mnoge od tih metoda su nepraktične, neučinkovite i potencijalno nesigurne. Najviše primjenjivana metoda za zaštitu životinja protiv mikotoksikoze je korištenje adsorbensa pomiješanog s hranom (Ramos i Hernandez, 1997; Huwig i sur., 2001; Đaković i sur., 2000).

4. Karakterizacija rizika

Analizom sastojaka krmiva, EFSA je ustanovila visoku razinu pridržavanja postojećih propisa o maksimalno dozvoljenim koncentracijama AFB₁ u hrani za životinje (EFSA, 2004). Temeljem toga, smatra da postojeća legislativa na zadovoljavajući način štiti od nepoželjnih posljedica ne samo ciljne životinjske vrste, nego i spriječava prelazak AFM₁ u mlijeko. Budući da nijedan analiziran uzorak kukuruza ni sojine sačme s hrvatskog tržišta nije sadržavao više od dozvoljene koncentracije, slično bi se moglo zaključiti o riziku za hrvatske potrošače.

Ipak, EFSA napominje da je 2003. godine u Italiji zabilježen neuobičajeno visok udio uzoraka mlijeka koji su sadržavali više od dozvoljene koncentracije AFM₁ uslijed visoke kontaminacije lokalno uzgojenog kukuruza (EFSA, 2004b). Modeliranjem je procijenjeno da kontaminacija krmiva kod dozvoljene koncentracije može dovesti do pojačanog prelaska AFM₁ u mlijeko zbog nekoliko specifičnih značajki mliječnih krava, iako praktična iskustva pokazuju da se to jako rijetko događa. Preporuka EFSA-e je, stoga, redoviti monitoring krmnih smjesa, kravljeg mlijeka te kukuruza i

njegovih proizvoda, naročito ukoliko je uzgojen u suptropskim krajevima uz primjenu opsežnih agrotehničkih mjera koje pogoduju rastu plijesni i sintezi aflatoksina.

Studijom utvrđene koncentracije fumonizina u kukuruзу su višestruko ispod maksimalne razine (60000 µg/kg) koju je preporučila Europska komisije (EC, 2006) te je rizik za ciljne životinjske vrste (naročito konje i svinje) minimalan. Budući da je, prema dostupnim studijama, slab prelazak fumonizina u jestiva tkiva životinja, uključujući mlijeko i jaja, ostaci u proizvodima animalnog podrijetla ne doprinose značajno ukupnoj izloženosti ljudi fumonizinima (EFSA, 2005).

Koncentracije ZEA u kukuruзу i sojinoj sačmi su daleko ispod preporuka Europske komisije (3000 µg/kg) te se može zaključiti da nema rizika za ciljne životinje. Istraživanjima je utvrđena ograničena raspodjela ZEA u meso i ostala jestiva tkiva te mala stopa prelaska u jaja i mlijeko (EFSA, 2004c). Stoga ne treba očekivati nikakve štetne posljedice u populaciji konzumacijom animalnih proizvoda dobivenih od životinja hranjenih krmivima s hrvatskog tržišta.

Europska komisija preporuča najvišu dozvoljenu koncentraciju DON-a u proizvodima od kukuruза od 12000 µg/kg (EC, 2006) i sve utvrđene vrijednosti u uzorcima analiziranim Studijom su znatno niže. Utvrđena je i ograničena transmisija DON-a u animalne proizvode zbog brze razgradnje u tijelu životinja (EFSA, 2004a). Rizik za potrošače unosom životinjskih proizvoda je općenito zanemariv.

ZAKLJUČCI

- Dobiveni rezultati studije „Pojavnost mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama u RH“ ukazuju na učestalu kontaminaciju pretraživanim mikotoksinima, ali u koncentracijama znatno nižim od maksimalno dozvoljenih koncentracija aflatoksina B₁ propisanih Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/2010). Također, ostali analizirani mikotoksini (zearalenon, fumonizini, deoksinivalenol) utvrđeni su u koncentracijama koje su ispod preporuka Europske komisije (EC, 2006).
- Aflatoksin B₁ je utvrđen u 20% svih uzoraka u rasponu koncentracija od 1 do 10 µg/kg (granica detekcije je 1 µg/kg), zearalenon u 12% uzoraka (16 do 100 µg/kg uz granicu detekcije 16 µg/kg), deoksinivalenol u 27% uzoraka (55 do 500 µg/kg uz granicu detekcije 55 µg/kg), dok su fumonizini detektirani u 33% uzoraka (220 do 2000 µg/kg uz granicu detekcije 220 µg/kg).
- Prosječna kontaminacija aflatoksinom B₁, deoksinivalenolom i zearalenonom je bila otprilike ista u kukuruзу i sojinoj sačmi. Fumonizini nisu nađeni niti u jednom uzorku sojine sačme, dok je 55% ispitanih uzoraka kukuruза imalo sadržaj fumonizina u rasponu od 220-2000 µg/kg.

- Unatoč činjenici je najveći rizik kontaminacije aflatoksinima u urodu uzgojenom u područjima sa suptropskom klimom, nije uočena značajna razlika u sadržaju aflatoksina B₁ u uzorcima sojine sačme podrijetlom iz Brazila u odnosu na one proizvedene u Hrvatskoj.
- Primijenjena tehnika analize mikotoksina (ELISA) može podcijeniti, ali i precijeniti koncentraciju mikotoksina u uzorcima. S toksikološkog stanovišta, precjenjivanje količine je često vezano uz toksine i metabolite sličnog potencijala štetnog djelovanja te zapravo daje korisnu informaciju tijekom screeninga sirovina. Primjerice, tzv. skriveni mikotoksini, na čije funkcionalne skupine su povezani šećeri, mogu se osloboditi iz konjugata tijekom probave i prijeći u izvoran, štetni oblik molekule.
- Rizik za ciljne životinje konzumacijom krmiva pripremljenih od analiziranih sirovina – minimalan je. Rizik za potrošače proizvoda animalnog podrijetla koji potječu od životinja hranjenih ovim krmivima zanemariv je zbog niske razine kontaminacije stočne hrane i općenito niskog prelaska ispitivanih mikotoksina u jestiva tkiva.

PREPORUKE

- Iako rezultati studije ne upućuju na značajan rizik za ciljne životinje i ljude, ne smije se zaboraviti da na razine mikotoksina u urodu presudan utjecaj imaju agroklimatski uvjeti u kritičnim fazama razvoja poljoprivredne kulture. Stoga je, imajući na umu mogućnost velike gospodarske štete, nužno kontinuirano provoditi analizu ključnih sirovina i gotovih krmih smjesa.
- Radi detaljnije procjene izloženosti životinja preporuča se u daljnja ispitivanja uključiti okratoksin A, T-2 i HT-2 toksine te analizirati veći broj različitih sirovina i krmnih smjesa. Analiza specifičnih krmnih smjesa za pojedine životinje treba biti usredotočena na mikotoksine na koje su te životinje posebno osjetljive (npr. hrana za svinje ili konje i fumonizini, ili hrana za svinje i deoksinivalenol, itd.).
- U ovom je istraživanju primijećeno da su neki uzorci kontaminirani s više mikotoksina. Iako za neke kombinacije mikotoksina postoje znanstveni dokazi o njihovom aditivnom ili sinergističkom djelovanju, to područje toksikologije mikotoksina nije dovoljno istraženo. Zbog toga je potrebno istraživati učinak istodobne izloženosti životinja različitim mikotoksinima.
- Zbog globalizacije tržišta na hrvatskom bi se tržištu žitarica i hrane za životinje mogle naći i žitarice s većom kontaminacijom mikotoksinima. Uvozom takve životinjske hrane ugrozilo bi se ne samo domaće životinje nego bi i ljudi koji se hrane

proizvodima životinja izloženih mikotoksinima putem hrane, mogli biti izloženi većim količinama mikotoksina. Stoga svakako treba nastaviti znanstvena istraživanja u sklopu specifičnih projekata, kao i analize u okviru Državnog programa monitoringa rezidua i Državnog plana službenih kontrola i monitoringa hrane za životinje Ministarstva poljoprivrede RH. Navedeni programi uključuju nadzor i određivanje mikotoksina u hrani i hrani za životinje.

- Budući da nema jedinstvenog tehnološkog procesa kojim bi se uklonili svi mikotoksini iz hrane za životinje, a dekontaminacija mikotoksina zahtjeva značajna financijska sredstva (čime se povećava cijena hrane) naglašavamo važnost prevencije nastanka mikotoksina. Prevenciju nastanka mikotoksina valja započeti u polju korištenjem dobre agrotehničke prakse (sjetvom zdravog i dorađenog sjemena, sjetvom sojeva otpornih na plijesni, plodoredom, izbalansiranom gnojidbom, dubokim zaoravanjem žetvenih ostataka, što ranijom žetvom i odvajanjem oštećenih zrna) te nastaviti pravilnim skladištenjem i transportom žitarica.

DOKUMENTACIJA DOSTAVLJENA HAH-U

-izvješće o provedbi Studije o mikotoksinima u hrani za životinje

- rezultati monitoringa mikotoksina u hrani za životinje za period od 2008. – 2011. godine

LITERATURA (REFERENCE)

- Abel S., Gelderblom W.C.A. (1998): Oxidative damage and fumonisin B₁-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo; *Toxicology* 131: 121-131.
- Abid-Essefi S., Ouanes Z., Hassen W., Baudrimont I., Mobio A.T., Creppy E.E., Bacha H. (2004): Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein synthesis and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone; *Toxicol Vitro* 18: 467-474.
- Abnet C.C., Borkowf C.B., Qiao Y.L., Albert P.S., Wang E., Merrill A.H. Jr., Mark S.D., Dong Z.W., Taylor P.R., Dawsey S.M. (2001): A cross-sectional study of human serum sphingolipids, diet and physiologic parameters; *Cancer Causes Control* 12: 821-828.
- Abramson, D. (1998): Mycotoxin formation and environmental factors. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food safety*, Sinha K.K., Bhatnagar D., Marcel Dekker, New York, 255-277
- Agüero, L.E.M., Alvarado, R., Martinez, A., Dorta, B. (2008): Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b₁ production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai; *Interciência* 33:219-222
- Alexander, J., Autrup, H., Bard, D. (2004): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal*, 89: 1-35
- Bagi, F., Balaž, F., Škrinjar, M. (2000): Količina mikotoksina zearalenona u zrnima pšenice od izolata *Fusarium graminearum* različite patogenosti; XI Jugoslavenski simpozij o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, 31
- Barbosa, M.A.G., Rehn, K.G., Menezes, M., Mariano, R.L.R. (2001): Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization; *Brazilian Journal of Microbiology* 32:98-104
- Bennett J .W., Klich M. (2003): Mycotoxins; *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516.
- Bergsjö, B., Matre, T., Nafstad I. (1992): Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs; *G. of Vet. Med.* 39: 752-758
- Betina, V. (1989) Mycotoxins - bioactive molecules, Zearalenone and its derivatives, volume 9. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 271-281
- Bhat R.V., Krishnamachari K.A.V.R. (1977): Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India; *Indian J Med Res* 66: 55-58.
- Bhat R.V., Shetty P.H., Amruth R.P., Sudershan R.V.(1997): A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins; *Clin Toxicol* 35: 249-255.

- Birzele, B., Prange, A., Kramer, J. (2000): Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters; *Food Addit. Contam.* 17, 1027-1035
- Bock C.H., Mackey B., Cotty P.J. (2004): Population dynamics of *Aspergillus flavus* in the air of an intensively cultivated region of south-west Arizona; *Plant Pathology* 53:422-433
- Carvalho, D.D.C., Mello, S.C.M., Lobo Junior, M., Silva, M.C. (2011): Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*; *Tropical Plant Pathology* 36:36-42
- Cavret, S. i Lecoeur S. (2006): Fusariotoxin transfer in animal; *Food and Chemical Toxicology* 44: 444-453
- Centers for Disease Control and Prevention (2004): "Outbreak of aflatoxin poisoning- Eastern and Central Provinces, Kenya, January-July 2004"; *Morbidity and Mortality Weekly Report* 53, 790-793.
- Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenon, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union* (2006/576/EC)
- Cotty P.J., Jaime-Garcia R. (2007): Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination; *Internat J Food Microbiol* 119;109-115.
- Creppy, E. E. (2002): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe; *Toxicology Letters*, 127: 19 – 28
- Cvaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources; *Journal of Chromatography A* 1101: 69 – 78
- Ćosić, J., Jajić, I., Jurković, D., Vrandečić, K., Velić, N., Matoša, M. (2008): Ability of *Fusarium graminearum* isolates to produce DON; *Proceedings of 4th International Congress Flour-Bread 07, Opatija*, 266-269
- Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2006): Influence of environmental factors on deoxynivalenol content in wheat flour; *Cereal Research Communications* 34(1):17-20
- Ćosić, J., Vrandečić, K. (2002) Biološke karakteristike *Fusarium graminearum* Schw. i *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc; *Poljoprivreda* 8(2):16-20
- Ćosić, J., Vrandečić, K., Svitlica., B. (2004): *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj; *Poljoprivreda* 10(1):5-8
- Delaš, F. (2010): Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Osijek (31-49)

- Deshpande, S.S. (1996): Enzyme immunoassays; From concept to product development. Chapman & Hall, New York
- Diener, U. i Davis, N. (1996): Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*; *Phytopathol.* 56: 390-393
- Dilkin P., Mallmann C.A., Almeida C.A.A. de, Stefanon E.B., Fontana F.Z., Milbradt E.L. (2002): Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period; *Brazilian Journal of Microbiology* 33(2):111-118
- D'Mello JPF, Porter JK, macdonald AMC, Placinda CM (1997): *Fusarium* mycotoxins. U: D'Mello, JPF Handbook of a Plant and Fungal Toxicants. CRC Press. Boca Raton 287-301
- Domijan A.M., Peraica M. (2010): Carcinogenic mycotoxins; U: Charlene A. McQueen, *Comprehensive Toxicology*, vol. 14, Elsevier, Oxford Academic Press, 125-137.
- Domijan A.M., Želježić D., Milić M., Peraica M. (2007): Fumonisin B₁: oxidative status and DNA damage in rats; *Toxicology* 232: 163-169.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Cvjetković, B., Turčin, S., Jurjević, Ž., Ivić, D. (2005): Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia; *Acta. Pharm.* 55, 349-356
- Doohan, F. M., Brennan, B.J., Cooke, M. (2003): Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals; *European Journal of Plant Pathology* 109: 755-768
- Duraković, L., Mrkonjić-Fuka, M., Skelin, A., Duraković, S., Redžepović, S. (2012): Assessment of aflatoxin M1 levels in ewe's raw milk used for the production of Istrian cheese *Mljekarstvo* 62 (1): 14-23
- Duraković, S., Duraković, L. (2003): *Mikologija u biotehnologiji*. Zagreb: Kugler.
- El-Makawy A., Hassanane M.S., Abd Alla E.S. (2001): Genotoxic evaluation for the estrogenic mycotoxin zearalenone; *Reprod Nutr Dev* 41: 79-89.
- Environmental Health Criteria 219 (2000), Fumonisin B₁, World Health Organization, Geneva.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed; *EFSA Journal* 39:1-27, 2004b
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed; *EFSA Journal* 89:1-35, 2004c
- FAO, Food and Nutrition Paper, Animal feeding and food safety, report of an Fao Expert Consultation, Rome, Italy, 10 to 14 March 1997

- Faraj, M. K., Smith, J. E., Harran, G. (1991): Interaction of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in irradiated maize seeds; *Food Additives and Contaminants* 8(6):731-736
- Fazekas, B., Hajdu, E.T., Tar, A.K., Tanyi, J. (2000): Natural deoxynivalenol (DON) contamination of wheat samples grown in 1998 as determined by high-performance liquid chromatography; *Acta Vet. Hung.* 48: 151-160
- Ferreira Geraldo, M. R., Tessmann, D. J., Kimmelmeier, C. (2006): Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil; *Brazilian Journal of Microbiology* 37:58-63
- Fink-Gremmels J., Malekinejad H. (2007): Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone; *Animal Feed Sci Technol* 137: 326-341.
- Gaffoor, I., Trail, F. (2006) Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*; *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1793-1799
- Gelderblom W.C.A., Kriek N.P., Marasas W.F., Thiel P.G. (1991): Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats; *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.
- Gelderblom W.C.A., Marasas W.F., Lebepe-Mazur S., Swanevelder S., Vessey C.J., Hall P.M. (2002): Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a short-term carcinogenesis model in rat liver; *Toxicology* 171: 163-173.
- Gelineau-van Waes J., Starr L., Maddox J., Aleman F., Voss K.A., Wilberding J., Riley R.T. (2005): Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanism in and in vivo mouse model; *Birth Defects Res. (Part A)* 73: 487-497.
- Goryacheva, I.Y., De Saeger, S. (2011): Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in food and feed. In: *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Woodhead Publishing
- Groopman J.D., Hall A.J., Whittle H. (1992): Molecular dosimetry of aflatoxin-N⁷-guanine in human urine obtained in The Gambia, West Africa; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1: 221-227.
- Guengerich F.P. (2003): Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions; *Arch Biochem Biophys* 409, 59-71.
- Hagler, W. M., Mirocha, C. J., Pathere, S. V., Behrens, J. C. (1979): Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* „Gibosum“ in rice culture; *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 849-853
- Halt M. (1994): *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ in flour production *Eur J Epidemiol*; 10 (5): 555-8

Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Casper, H.H., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R. (1996): Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat or their combination on growing barrows; *Am. J. Vet. Res.* 57: 1790-1794

Hengstler J.G., van der Burg B., Steinberg P., Oesch F. (1999): Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity; *Drug Metabol Rew* 31: 917-970.

Henry, S., Bosch, F., Browsers, J. (2002): Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risk; *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 229-233

Hotger, S. (2000) : Bessere Hygiene steigert das Image der Futtermittelproduktion, *Kraftfutter/ Feed magazine* 6: 241-247

Husain, Z., Khan, M. Z., Khan, I., Javed, M., Saleemi, K., Mahmood, S., Asi M. R. (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels; *Food and Chemical Toxicology* 48: 3304-3307

Hussein, S. H. i Brasel, J. M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals; *Toxicology* 167: 101-134

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. (2001): Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents; *Toxicology Letters* 122: 179-188

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; *IARC Monographs on the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol 56. Lyon: IARC.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002): Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Cracinogenic Risks to Humans*, Vol 82., Lyon

IPCS (2001): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Add Series* 47; WHO, Geneva

Jakić-Dimić, D., Nešić, K., Savić, B., Kečkeš, J., Pisinov, B. (2010): Prisustvo plesni u hrani za ishranu živine i utjecaj kontaminenata na zdravstveno stanje; XIV Međunarodni simpozijum „Tehnologija hrane za životinje“, 19-21. oktobar 2010, Novi Sad. Zbornik radova, 107-113

Janssen, M.M.T., Put, H.M.C. i Nout, M.J.R. (1997): Natural toxins. In: De Vries, J.: *Food Safety and Toxicity*. CRC Press LCC, Florida (Chapter II)

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarch, A., Lebrihi, A. (2009): Biotransformation of mycotoxin zearalenon by a fungal strain of *Aspergillus niger*, ISM Conference „Worldwide Mycotoxin in Food and Feed Chains“, Abstract 098, 123

- Jiménez, M., Máñez, M., Hernández, E. (1996): Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species; *International Journal of Food Microbiology* 29(2-3):417-421
- Jurjević, Ž., Solfrizzo, M., Cvjetković, B., Avantaggiato, G., Visconti, A. (1999): Ochratoxin a and fumonisins (b1 and b2) in maize from balcan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia; *Mycotoxin Research* 15 (2): 67-80
- Kensler T.W., Groopman J.D. (1997): Carcinogen mycotoxins. U: Bowden GT, Fischer SM (eds.) *Comprehensive Toxicology*. Elsevier Vol. 12, Chap. 12, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens, 201-223.
- Kiermeier, F. i Hemmerich, K. (1974): Influence of light on watery aflatoxin B₁ solutions; *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 155: 81-84
- Kišpatić, J. (1985): Mikotoksini fusarium vrsta. Seminar za zaštitu bilja (Opatija 20-21. 01. 1985.) Zbornik radova. Zagreb 1985: 481-487.
- Klarić M.S., Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2009): Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography; *Arh Hig Rada Toksikol.* 60(4):427-34
- Klein P.J., Buckner R., Kelly J., Coulombe R.A. Jr. (2000): Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkey to aflatoxin B₁; *Toxicol Appl Pharmacol* 165: 45-52.
- Knežević, Z. (2007): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima, *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 9 (3)
- Koehler, P.E., Beuchat, L.R., Chinnan, M.S. (1985): Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal; *J. Food Protect.* 48:1040–1043
- Krishnamachari K.A.V.R., Bhat R.V., Nagarajan V., Tilak T.B.G. (1975): Hepatitis due to aflatoxicosis; *Lancet* 1061-1063.
- Krska, R., Molinelli, A. (2007): Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:145-148
- Li D., Cao Y., He L. i sur.(1993): Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China; *Carcinogenesis* 14: 169-173.
- Lindsay D.G. (1985): Zeranol – a „nature-identical“ oestrogen; *Fd Chem Toxic* 23: 767-774.
- Louzada, G.A. de S., Carvalho, D.D.C., Mello, S.C.M., Lobo Junior, M., Martins, I., Brauna, L.M. (2009.): Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*; *Biota Neotropica* 9:145-149

- Lovreško, V. (2011): Aflatoksin B1 i okratoksin A u hrani životinjskog podrijetla završni rad - preddiplomski studij. Zagreb : Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 15.09. 2011.
- Mann, G., Coifer, L. i Dollear, F. (1967): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals; J. Agric. Food Chem. 15: 1090-1092
- Maragos, C.M. (2009): Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis; Analytical and Bioanalytical Chemistry 395:1205-1213
- Marasas W.F., Riley R.T., Hendricks K.A., Stevens V.L., Sadler T.W., Gelineau-van Waes J., Missmer S.A., Cabrera J., Torres O., Gelderblom W.C.A., Allegood J., Martinez C., Maddox J., Miller J.D., Starr L., Sullards M.C., Roman A.V., Voss K.A., Wang E., Merrill A.H. Jr. (2004): Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among population consuming fumonisin-contaminated maize; J Nutr 134: 711-716.
- Marin S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. (1995.): Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain; Lett. Appl. Microbiol. 21(5):298-301
- Marpegan, M.R., Perfumo, C.J., Godoy, H.M., De Miguel, M.S., Diaz, E., Risso, M.A. (1988): Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. J. Vet. Med. A. 35: 610-616
- Marth, E. i Dole, M. (1979.): Update on molds: degradation of aflatoxin; Food tehnol. 33: 81-87
- Martinez-Larranga M.R., Anadon A., Diaz M.J., Fernandez-Cruz M.L., Frejo M.T., Martinez M., Fernandez R., Anton R.M., Morales M.E., Tafur M. (1999): Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B₁; Vet Hum Toxicol 41: 357-362.
- McGlynn K.A., London W.T. (2005): Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma; Best Practice Res Clin Gastroenterol 19: 3-23.
- Milano G.D., Lopez T.A. (1991): Influence of temperature on zearalenone production by regional strains of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* in culture; International Journal of Food Microbiology 13(4):329-333
- Miraglia, M., Egmond, H. P., Brera, C., Gilbert, J. (1998) Mycotoxins and Phycotoxins in chemistry, toxicology and food safety; Alaken Inc. Fort Collins, Colorado, 363-397
- Misner S.A., Suarez L., Felkner M., Wang E., Merrill A.H. Jr., Rothman K.J., Hendricks K.A.. (2006): Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border; Environ Health Perspect 114: 237-241.
- Mitak M. (2000): Nalaz zearalenona u krmivima i krmnim smjesama za svinje od 1990. do 1999. godine; Zbornik radova 2.hrvatski veterinarski kongres, Cavtat 10.-13.-10. 2000., 483 – 488

- Mitak, M. (1993): Prirodna kontaminacija mikotoksinom zearalenonom i mogućnosti brzog dokazivanja u terenskim uvjetima; Vet. Stanica 24: 139-148
- Mitak, M. (1998): Utjecaj subtoksičnih doza atrazina i zearalenona na reprodukciju štakora; Disertacija. Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu
- Mitak, M., Gojmerac, T., Pavičić, P., Topolko, S. (2001): Kontaminacija krmiva i krmnih smjesa za svinje zearalenonom u razdoblju od 1990 – 1999. godine; Vet.stanica 32 (4): 205-209
- Mitak, M., Gojmerac, T., Pavičić, P., Topolko, S. (2001): Kontaminacija krmiva i krmnih smjesa za svinje zearalenonom u razdoblju od 1990 – 1999. godine; Vet. stanica 32: 205-209
- Mitak, M., Pleadin, J., Perši, N., Vulić, A., Zadavec, M. (2011): Mikotoksini u krmnim sirovinama i smjesama tijekom 2009. i 2010. godine; Veterinarska stanica 42 (2): 139-145
- Mitak, M., Zadavec, M., Gojmerac, T., Cvetnić, Ž. (2005): Kontaminacija zearalenonom kukuruza roda 2004; Vet. stanica 36: 95-100
- Mitak, M., Zadavec, M., Karačić, V. (2003): Prirodna kontaminacija deoksinivalenolom (vomitoksinom) kukuruza roda 1999. godine; Krmiva 45 (2): 77-79
- Mitterbauer, R., Weindorfer, H., Safaie, R., Lemmens, M., Ruckenbauer, P., Kuchler, K., Adam, G. (2003) A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity; Appl. Environ. Microbiol 69: 805-811
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapf, M.W., Vogel, R.F. and Niessen, L. (2004): Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. European Journal of Plant Pathology 110: 651- 659
- Munk, M. i Topolko, S. (1978): Ispitivanje frekvencije mikotoksina u krmivima; Krmiva 20: 95-96
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. (2006): Food mycotoxins: An update; Journal of Food Science 71:51-65
- Naglić, T., Hajsig, D., Madić, J., Pinter, L.J. (2005): Veterinarska mikrobiologija - Specijalna bakteriologija i mikologija: Mikotoksikoze, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo
- National Toxicology Program (NTP) (1999): Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Fumonisin B₁ (CAS No. 116355-83-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice.
- National Toxicology Program, NTP (2009): Chemical Information Review Document for Deoxynivalenol
- Ngindu A., Johnson B.K., Kenya P.R., Ngira J.A., Ocheng D.M., Nandwa H., Omondi T.N., Jansen A.J., Ngare W., Kaviti J.N., Gatei D., Siongok T.A. (1982): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya; Lancet 1346-1348.

- Norred W.P., Plattner R.D., Chamberlain W.J. (1993): Distribution and excretion of [¹⁴C] fumonisin B₁ in male Sprague-Dawley rats; *Natural Toxins* 1: 341-346.
- Osweiler, G. D. (1996) *Toxicology, The national veterinary medical series for independent study: Zearalenone*. Lippincott Williams & Wilkins, USA
- Ožegović, L. i Pepeljnjak, S. (1995): *Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb*
- Panigrachi, S. (1997): *Alternaria toxins*. U: D'Mello JPF *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. CRC Press, Boca Raton 319-337
- Pathre, S.V., Mirocha, C.J. (1978): Analysis of deoxynivalenol from cultures of *Fusarium* species. *Appl. Env. Microbiol.* 35: 992-994
- Pavičić P., Brlek, V., Nemanič, A. (1999): Učestalost fuzarijskih mikotoksina u krmnim smjesama 1989. – 1998.; *Krmiva* 41 (4): 183 – 189
- Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Šegvić Klarić, M. (2008): Okratoksin A i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi; *Krmiva* 50 (3): 147-159
- Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Šegvić-Klarić, M. (2008): Okratoksin i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi; *Krmiva* 3: 147-159
- Pepeljnjak, S., Čuturić, S., Topolko, S., Munk, M. (1979): Faktori koji utječu na stvaranje mikotoksina kod kukuruza; *Krmiva* 5: 109-112
- Peraica M., Domijan A.M., Jurjević Ž., Cvjetković B. (2002): Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed; *Arhiv Hig Rada Toksikol* 53: 229-237.
- Peraica M., Ljubanović D., Želježić D., Domijan A.M. (2008): The effect of a single dose of fumonisin B₁ on rat kidney; *Croat Chem Acta* 81: 119-124.
- Peraica, M., Domijan, A. (2001): Contamination of food with mycotoxins and human health; *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 52: 23-35
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C.(1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins; *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37
- Plavšić, F., Žuntar, I. (2006): *Uvod u analitičku toksikologiju, Zagreb: Školska knjiga.*
- Pleadin, J.; Perši, N.; Mitak, M.; Zadavec, M.; Sokolović, M.; Vulić, A. Jaki, V.; Brstilo, M. (2012): The natural occurrence of T-2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia; *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 88 (6): 863-866
- Pleadin, J.; Sokolović, M.; Perši, N.; Zadavec, M.; Jaki, V.; Vulić, A. (2012): Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia; *Food control*. (prihvaćen za objavljivanje)

- Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska J. (2003): Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography; *Anal. Chim. Acta* 483: 61-67
- Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkitasubramanian, T. (1975): Fluorescence changes of aflatoxin B₁ and G₁; *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 159: 319-322
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (N.N. 154/2008)
- Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (N.N. 80/10)
- Prelusky, D.B., Gerdes, R.G., Underhill, K.L., Rotter, B.A., Jui, P.Y., Trenholm, H.L. (1994): Effects of low-level dietary deoxynivalenol on hematological and clinical parameters of the pig; *Nat. Toxins* (2) 97-104
- Ramirez M.L., Chulze S., Magan N. (2006): Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain; *International Journal of Food Microbiology* 106(3):291-296
- Reddy K.R.N., Raghavender C.R., Reddy B.N., Salleh B. (2010): Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B₁ production in sorghum grains; *African Journal of Biotechnology* 9(27):4247-4250
- Richard, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119: 3 – 10
- Richardson K.E., Hagler W.M., Mirocha C.J. (1995): Production of zearalenone a- and b-zearalenol and a- and b-zearalanol by *Fusarium* spp. in rice culture; *J Agric Food Chem* 33: 862
- Russo, J.R., i Yanong, R.P.E. (2002): *Molds in Fish Feeds and Aflatoxicosis*. University of Florida IFAS Extension.
- Saenz de Rodrigez C. (1984): Environmental hormone contamination in Puerto Rico; *N.Engl. J. Med.* 310: 1741 – 1742.
- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan N. (2011): Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species; *J.R. Soc. Interface* 54:117-126
- Smith, J.E. (1997): Aflatoxins. U: D'Mello JPF *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. CRC Press, Boca Raton 319-337
- Soriano J.M., Dragacci S. (2004): Occurrence of fumonisins in foods; *Food Res Internat* 37: 985-1000.
- Srebočan, V. (1993): *Veterinarska toksikologija: Biotoksini (mikotoksini)*. Zagreb: Medicinska naklada.

- Stec, J., Zmudzki, J., Rachubik, J., Szczotka, M. (2009): Effects of aflatoxin B1, ochratoxin A, patulin, citrinin and zearalenone on the *in vitro* proliferation of pig blood lymphocytes; Bull. Vet. Inst. Pulawy. 53: 129-134
- Suttajit, M. 1989. Prevention and Control of Mycotoxins. U knjizi: Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains. (R.L. Semple, A.S. Frio, P.A. Hicks i J.V.. Lozare), FAO
- Svitlica, B. (2010): Patogenost Fusarium vrsta za kukuruz; Doktorski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
- Svitlica, B., Ćosić, J., Šimić, B., Vrandečić, K., Bunjevac, I., Božić, M. (2011): Utjecaj uvjeta uzgoja na porast i sporulaciju Fusarium vrsta; Poljoprivreda 17(1):42-46
- Szuets, P., Mesterhazy, A., Falkay, G., Bartok, T. (1997): Early thelarche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuff; Cereal Res Comm. 25: 429-436
- Šegvić Klarić, M., Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Kosalec, I. (2008): Komparacija ELISA i TLC/HPLC metoda za određivanje ZEA i OTA u žitaricama i krmu; Krmiva 50: 235-244
- Šegvić-Klarić, M., Pepeljnjak, S. (2004): Raširenost i toksinogenost plijesni u hrani; 1. Hrvatski znanstveni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem. Mikotoksini aspekti i prevencija, Zagreb 10.12. 2004.
- Šperanda, M., Liker, B., Šperanda, T., Šerić, T., Antunović, Z., Grabarević, Ž., Senčić, Đ., Steiner, Z. (2005): The effect of clinoptilolite on haematological and biochemical indicators of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone, <http://www.bib.irb.hr/datoteka/252289.SperandaM.doc>
- Šumić, Z. (2009): Mikotoksini <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/plesni/mikotoksini>
- Tandon B.N., Krishnamurthy L., Koshy A., Tandon H.D., Ramalingaswani V., Bhandari J.R., Mathur M.M., Mathur P.D. (1977): Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in Northwest India; Gastroenterology 72: 488-494.
- Terzić, S. Pleadin, J., Šandor, K., Vulić, A., Perši, N. Žarković, I., Andrišić, M., Jemeršić, L., Weber Sušan, M. (2012): Aflatoxin B1 in wheat bran containing premix; Veterinarski Arhiv 82 (2): 155-166
- Trenholm, H.L., Cochrane, W.P., Cohen, H., Ellio, J.I., Farnworth, E.R., Friend, D.W., Hamilton, R.M.G., Standish, J.F., Thompson, B.K. (1983): Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario white winter wheat crop: results of survey and feeding trial. J. Assn. Off. Anal. Chem. 66: 92-97
- Türker L., Gümüs, S. (2009): A theoretical study of vomitoxin and its tautomer; Journal of Hazardous Materials 163: 285-294
- Turner, H.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins; *Analytica Chimica Acta* 632:168-180

- Ueno Y., Iijima K., Wang S.D., Suguira Y., Sekijima M., Tanaka T., Chen C., Yu S.Z. (1997): Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA; *Food Chem Toxicol* 35: 1143-1150.
- Uraguchi, K., Yamazaki, M. (1978): *Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins*. Halsted Press, New York, USA 1978
- Utermark, J., Karlovsky, P. (2007): Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 637-642
- Valpotić, H. i Šerman, V. (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja; *Krmiva* 48: 33-42.
- Van Egmond, H. i Speijers, G. (1990): Food contaminants, naturally occurring toxicants in foodstuffs; *Mycotoxins*, *Food Laboratory News* 20: 38-45
- Vesonder, R.F., Ciegler, A., Burmeister, H.R., Jensen, A.H. (1979): Acceptance by swine and rats of corn amended with trichotecenes. *Appl. Env. Microbiol.* 38: 433-346
- Visconti A., Pascale M. (1998): Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection; *J Chromatog A* 815: 133-140.
- Voss K.A., Smith G.W., Haschek W.M. (2007): Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity; *Animal Feed Sci Technol* 137: 299-325.
- Wang E., Riley R.T., Meredith F.I., Merrill A.H. Jr. (1999): Fumonisin B₁ consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *J Nutrit* 129: 214-220.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I., (1991): Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*; *Int. J. Food Microbiol.* 12: 141-149
- Whitaker, Thomas B., Slate, Andrew B. i Johansson, Anders S. (1988): Sampling feeds for mycotoxin analysis, *The Mycotoxin Blue Book*, 1-25
- Whitlow, L. W., Diaz, D. E., Hopkins, B. A. i Hagler, W. M. (2006): Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk; <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-potential-t199/p0.htm>
- Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E. Stiles J.K. Jolly C., Aggarwal D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions; *Am J Clin Nutr* 80: 1106-1122.
- Wogan, G. (1999): Aflatoxin as a human carcinogen; *Hepatology* 30: 573-575
- Wood, G.E. (1992): Mycotoxins in foods and feeds in US; *J. Anim. Sci.* 70: 3941-3949

Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin; *Fd Chem Toxicol* 45: 1-18.

Zinedine, A. i Manes, J. (2009): Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco; *Food Control* 20: 334-344

Zollner, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacher, H., Kuhn, T., Hochsteiner, W., Lindner, W. (2002): Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue and liver samples of pigs fed with mycotoxin-concentrated oats; *J. Agri. Food Chem.* 24: 2494-2501